



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

Τμήμα ΙΑΤΡΙΚΗΣ

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ»**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Θέμα: Συχνότητα ανίχνευσης Μυκοπλάσματος και Ουρεοπλάσματος σε
ασυμπτωματικές γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας στην περιοχή της
Θεσσαλίας**

Σεραφείμ Α. Φουντάς

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

- Ευθυμία Πετεινάκη, Καθηγήτρια, Επιβλέπουσα
- Αναστάσιος Γερμενής, Καθηγητής
- Κωνσταντίνος Νταφόπουλος, Καθηγητής

Διπλωματική Εργασία υποβληθείσα στο Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας ως μέρος των απαιτήσεων για την απόκτηση Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στις «Κλινικές Εφαρμογές Μοριακής Ιατρικής»

Λάρισα, Οκτώβριος, 2017



UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCE
FACULTY OF MEDICINE

MASTER PROGRAM IN
“CLINICAL APPLICATIONS OF MOLECULAR MEDICINE”

MASTER THESIS

TITLE: Prevalence of Mycoplasma and Ureaplasma species in asymptomatic women of reproductive age in the region of Thessaly

By

Serafeim A. Fountas

Three-member Selection Board:

- Eythymia Petinaki, Professor, Supervisor
- Anastasios Germanis, Professor
- Konstantinos Dafopoulos, Professor

Master Thesis submitted to the Faculty of Medicine of the University of Thessaly in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master in Clinical Applications of Molecular Medicine

Larissa, October, 2017

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια: Ευθυμία Πετεινάκη, Ιατρός-Βιοπαθολόγος, Καθηγήτρια Ιατρικής Βιοπαθολογίας-Κλινικής Μικροβιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και Διευθύντρια του Μικροβιολογικού Εργαστηρίου του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας

Αναστάσιος Γερμενής, Καθηγητής Εργαστηριακής Ανοσολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και Διευθυντής του Εργαστηρίου Ανοσολογίας και Ιστοσυμβατότητας του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας

Κωνσταντίνος Νταφόπουλος, Καθηγητής Μαιευτικής & Γυναικολογίας Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και Υπεύθυνος Μονάδας Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την **Καθηγήτρια Μικροβιολογίας κα Ευθυμία Πετεινάκη**, η καθοδήγηση της οποίας, καθώς και οι συμβουλές της υπήρξαν καθοριστικές και συνετέλεσαν τα μέγιστα προς την επιτυχή ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας. Η συμπαράστασή της δε, ήταν συνεχής καθ' όλη τη διάρκεια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος, ενώ με την πολύτιμη αρωγή της κατάφερα να παρακολουθήσω και να ολοκληρώσω επιτυχώς το Μεταπτυχιακό.

Ευχαριστώ ολόψυχα και τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς επιτροπής:

Καθηγητή κ. Αναστάσιο Γερμενή, για τη δυνατότητα που μου παρείχε, όπως συμμετάσχω στο εν λόγω Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα, αλλά και το ενδιαφέρον που επέδειξε προς εμένα ως προς τη διαρκή παροχή γνώσεων και επίλυση αποριών.

Καθηγητή κ. Κωνσταντίνο Νταφόπουλο, για την πολύτιμη αρωγή του κατά τη διάρκεια φοίτησής μου στο εν λόγω Μεταπτυχιακό, καθώς και την ουσιώδη βοήθεια που μου παρείχε κατά την εκπόνηση της Διπλωματικής μου Εργασίας.

Επιπλέον, ευχαριστώ την **κα Ζωή Φλώρου**, Υποψήφια Διδάκτορα του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας, καθώς και **όλο το Προσωπικό του Εργαστηρίου** για την σημαντική συμβολή τους στην εκπόνηση της Διπλωματικής μου Εργασίας.

Τέλος, ευχαριστώ τη Γραμματέα του Μεταπτυχιακού Προγράμματος κα. **Νούτσου Βασιλική** για το αδιάλειπτο ενδιαφέρον της καθ' όλη τη διάρκεια του προγράμματος και της εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας.

«Κάλλιον το προλαμβάνειν ή το θεραπεύειν».

Ιπποκράτης, 460-377 π.Χ.,

«Πατέρας της Ιατρικής»

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	13
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	15
ABSTRACT	17
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	19
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	19
1.1 <i>Mycoplasma spp.</i> και <i>Ureaplasma spp.</i>	22
1.1.1 <i>Mycoplasma genitalium</i>	25
1.1.2 <i>Mycoplasma hominis</i>	28
1.1.3 <i>Ureaplasma urealyticum</i> και <i>Ureaplasma parvum</i>	29
1.2 Εργαστηριακές μέθοδοι ανίχνευσης και διάγνωσης Μυκοπλασμάτων	32
1.2.1 Καλλιέργεια Μυκοπλασμάτων	33
1.2.2 Διαθέσιμες δοκιμασίες ανίχνευσης Μυκοπλασμάτων στο εμπόριο	35
1.2.3 Ορολογικές δοκιμασίες.....	36
1.2.4 Μοριακές μέθοδοι	37
A. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης- (PCR- Polymerase Chain Reaction).....	37
B. Διπλή PCR (nested PCR).....	39
Γ. PCR Πραγματικού Χρόνου (Real –Time PCR)	40
1.3 ΣΚΟΠΟΣ.....	41
2. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ - ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	43
2.1 Συλλογή και προέλευση των δειγμάτων.....	43
2.2 Εξαγωγή DNA από δείγματα (DNA-Extraction).....	44
2.3 Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR)	44
2.4 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης	48
2.5 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real – Time PCR).....	50
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	55
3.1 Αποτελέσματα της ανίχνευσης και ταυτοποίησης των μικροοργανισμών	55
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	59
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	63
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	69

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

BV	Βακτηριακή κολπίτιδα (Bacterial Vaginosis)
CFU/ml	Colony-Forming Units per milliliter
DNA	Δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ
dNTPs	DeoxyriboNucleotide TriPhosphate (διδεοξυριβονουκλεοτίδια)
G+C	Γουανίνη και Κυτοσίνη
MBA	Multiple Banded Antigen
MH	<i>Mycoplasma hominis</i>
NAATs	Μέθοδοι ενίσχυσης νουκλεϊκών Οξέων (Nucleic Acid Amplification Tests)
NGU	Ουρηθρίτιδα, μη-γονοκοκκική
PCR	Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction)
PID	Οξεία Πυελική Φλεγμονή (Pelvic Inflammatory Disease)
PPROM	Προ του τέρματος ρήξη των εμβρυϊκών υμένων (Preterm Premature Rupture of Membranes)
RIF	Επανειλημμένες αποτυχίες εμφύτευσης (Recurrent Implantation Failure)
RPL	Καθέξιν Αποβολές (Reccurent Pragnancy Loss)
Spp	Species (είδη)
UPA	<i>Ureaplasma parvum</i>
UUR/UU	<i>Ureaplasma urealyticum</i>

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην οικογένεια των *Mycoplasmataceae* και στην κλάση των *Mollicutes* (μυκοπλάσματα) ανήκουν μικροοργανισμοί οι οποίοι σχετίζονται με λοιμώξεις του ουροποιογεννητικού συστήματος στον άνθρωπο και είναι οι εξής: *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*, *Ureaplasma urealyticum* και *Ureaplasma parvum*.

Οι λοιμώξεις που προκαλούν είναι οι ακόλουθες: μη-γονοκοκκική ουρηθρίτιδα (NGU), προστατίτιδα, επιδιδυμίτιδα, κολπίτιδα, σαλπινγίτιδα και η οξεία πυελική φλεγμονή (PID-Pelvic Inflammatory Disease). Ενοχοποιούνται επιπλέον και για υπογονιμότητα σε γυναίκες και άνδρες, ενώ με βάση τη διεθνή βιβλιογραφία εμπλέκονται και σε πολυάριθμες μαιευτικές-περιγεννητικές επιπλοκές.

Η ανίχνευση των παθογόνων αυτών είναι δυσχερής στο Μικροβιολογικό Εργαστήριο, δεδομένου ότι δεν αναπτύσσονται σε κοινά θεραπευτικά υλικά. Συνεπώς οι κλινικοί επιστρατεύουν Μοριακές μεθόδους για την ανίχνευση των παθογόνων αυτών.

Το *U.urealyticum* και το *M.hominis* έχουν συσχετισθεί με ποικίλες λοιμώξεις, αλλά επί της διεθνούς βιβλιογραφίας δεν υπάρχει ομοφωνία σχετικά με τον παθογενετικό τους ρόλο, δεδομένου ότι ανευρίσκονται αρκετά συχνά και στην χλωρίδα φυσιολογικών ατόμων. Πιο πιθανό είναι ότι δρουν ως ευκαιριακά παθογόνα. Το *U.urealyticum* και το *U.parvum* αποικίζουν τον κόλπο ασυμπτωματικών γυναικών σε ποσοστό 40 με 80% ενώ το *M.hominis* σε ποσοστό 21 με 53%. Ο αποικισμός εξαρτάται από ποικίλους παράγοντες με κυρίαρχο την σεξουαλική δραστηριότητα.

Στη χώρα μας τα επιδημιολογικά δεδομένα σχετικά με τον επιπολασμό των ουρογεννητικών λοιμώξεων από *Mycoplasma spp.* και *Ureaplasma spp.* παραμένουν πλημμελή, ενώ για την περιοχή της Θεσσαλίας δεν υπάρχει κάποια ανάλογη μελέτη, γεγονός που συνέβαλε στην πραγματοποίηση της παρούσας εργασίας.

Σκοπός της εργασίας είναι ο προσδιορισμός της συχνότητας του μυκοπλάσματος και του ουρεαπλάσματος στο ουρογεννητικό σύστημα γυναικών κυρίως αναπαραγωγικής ηλικίας, που προσήλθαν στα εξωτερικά ιατρεία της Γυναικολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας από την περιοχή της Θεσσαλίας σε περίοδο ενός οκταμήνου, Ιούνιος 2015 – Φεβρουάριος 2016. Η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε βασίστηκε στην μοριακή ανίχνευση και ταυτοποίηση των συγκεκριμένων παθογόνων άμεσα στο κλινικό δείγμα των γυναικών της μελέτης.

ABSTRACT

Mycoplasma hominis, *Mycoplasma genitalium*, *Ureaplasma urealyticum* and *Ureaplasma parvum* are microorganisms which belong to the *Mycoplasmataceae* species. These pathogens tend to cause a variety of infections regarding the human genitourinary tract, examples of which are the following: non gonococcal urethritis, prostatitis, salpingitis, pelvic inflammatory disease. Furthermore, according to the literature, they are associated with both male and female infertility, while also with numerous perinatal and obstetric complications.

Reliable detection of the above pathogens can only be made using methods of Molecular Medicine. There is no consensus throughout the literature, regarding the pathogenetic role of these microorganisms, considering the fact that their prevalence among healthy individuals is high. Thus, they are often considered as agents of the normal vaginal flora.

Several studies report that *U.urealyticum* and *U.parvum* tend to colonize the vagina of healthy women up to 80%, while *M.hominis* up to 53% respectively. On the other hand the colonization of healthy individuals tends to be multifactorial. The number of sexual partners plays a crucial role in the latter. In Greece, epidemiological data are lacking, in regard of the above pathogens' prevalence among asymptomatic women. Especially in the region of Thessaly they seem to be very few, if none.

Aim of our study was to determine the prevalence of *Mycoplasma* and *Ureaplasma spp* in asymptomatic, sexually active women mainly of reproductive age. These women were residents of Thessaly and their examination was made by medical doctors at the Department of Gynecology of the University Hospital of Larissa during an eight-month period (June 2015-February 2016). Real-Time PCR was stratified for the detection of pathogens in the clinical samples of the above asymptomatic women.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Στην οικογένεια των *Mycoplasmataceae* και στην κλάση των *Mollicutes* (μυκοπλάσματα) ανήκουν μικροοργανισμοί οι οποίοι σχετίζονται με λοιμώξεις του ουροποιογεννητικού συστήματος στον άνθρωπο και είναι οι εξής: *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*, *Ureaplasma urealyticum* και *Ureaplasma parvum*.

Οι λοιμώξεις που προκαλούν τα συγκεκριμένα παθογόνα στο ουρογεννητικό σύστημα του ανθρώπου είναι οι ακόλουθες: η μη-γονοκοκκική ουρηθρίτιδα (NGU), η προστατίτιδα, η επιδιδυμίτιδα, η σπερματοδοχοκυστίτιδα, η κολπίτιδα, η σαλπινγίτιδα και η οξεία πυελική φλεγμονή (PID-Pelvic Inflammatory Disease). Ενοχοποιούνται επιπλέον και για υπογονιμότητα σε γυναίκες και άνδρες. Επίσης, οι μικροοργανισμοί αυτοί ενοχοποιούνται ενίοτε, με βάση τη διεθνή βιβλιογραφία, για πρόωρο τοκετό, αυτόματες αποβολές και γεννήσεις νεογνών χαμηλού σωματικού βάρους [1].

Ο χρόνος επώασής τους είναι 10-20 μέρες. Τα συμπτώματα είναι ήπια, ενώ στο 1/3 των ασθενών μπορεί να απουσιάζουν πλήρως. Το έκκριμα που προκαλούν τα εν λόγω παθογόνα είναι λιγοστό σε ποσότητα και υδαρές σε υφή, ενώ δύναται να συνυπάρχει μετρίου βαθμού δυσουρία στον άνδρα. Αντιθέτως, στις γυναίκες η συμπτωματολογία εκ της ουρήθρας αναφέρεται σπανίως. Επίσης, ο κνησμός, η δυσπαρευνία ή και η δυσουρία αναφέρονται σπάνια.

Τόσο τα Μυκοπλάσματα όσο και τα Ουρεοπλάσματα διαθέτουν ένα κύριο χαρακτηριστικό, την έλλειψη κυτταρικού τοιχώματος, ενώ μία κυτταρική μεμβράνη τριών στρωμάτων περιέχουσα στερόλες, αποτελεί το περίβλημά τους. Η απουσία κυτταρικού τοιχώματος των μικροοργανισμών αυτών, είναι αυτή που τους προσδίδει την ικανότητα να εμφανίζουν ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά που δρουν επί του κυτταρικού τοιχώματος (β-λακτάμες) και αδυναμία βαφής με χρώση κατά Gram. Παλαιότερα, τα συγκεκριμένα παθογόνα κατατάσσονταν στους ιούς λόγω του πολύ μικρού τους μεγέθους, αφού σχηματίζουν πολύμορφα νημάτια (πλειομορφικό σχήμα) με μέση διάμετρο 0,1-0,3μm. Άλλο χαρακτηριστικό τους είναι η ο πολλαπλασιασμός μέσω διχοτόμησης καθώς και το γεγονός ότι συνιστούν προαιρετικώς αναερόβιους μικροοργανισμούς. Το γενετικό υλικό που εμπεριέχουν είναι περιορισμένο. Συνεπώς, έχουν μειωμένη βιοσυνθετική ικανότητα. Η ανάπτυξή τους σε κοινά θρεπτικά υλικά είναι δυσχερής. Αναπτύσσονται σε ειδικά θρεπτικά υλικά χωρίς κύτταρα εμπλουτισμένα με χοληστερόλη.

Στο Κλινικό Μικροβιολογικό Εργαστήριο, η ανίχνευση των παθογόνων αυτών είναι δύσκολη, δεδομένου ότι οι μικροοργανισμοί αυτοί δεν αναπτύσσονται σε κοινά θρεπτικά υλικά. Έτσι, οι μοριακές τεχνικές έρχονται σε αυτό το σημείο να συμβάλλουν στην διάγνωση των λοιμώξεων αυτών και να υπερκεράσουν τις λοιπές συμβατικές μεθόδους που αδυνατούν να ανιχνεύσουν τα παθογόνα αυτά αξιόπιστα και γρήγορα.

Οι διαγνωστικές μέθοδοι που απαιτούνται για την ανίχνευση των εν λόγω παθογόνων, πρέπει να είναι κατάλληλες, ήτοι, να χαρακτηρίζονται από υψηλή ταχύτητα και ευαισθησία. Τούτο, διότι η αυξημένη συχνότητα στον γενικό πληθυσμό, του αποικισμού των μυκοπλασμάτων και ουρεοπλασμάτων και η συμμετοχή τους στην παθογένεια ποικίλων λοιμώξεων απαιτεί την χρήση των κατάλληλων διαγνωστικών μεθόδων.

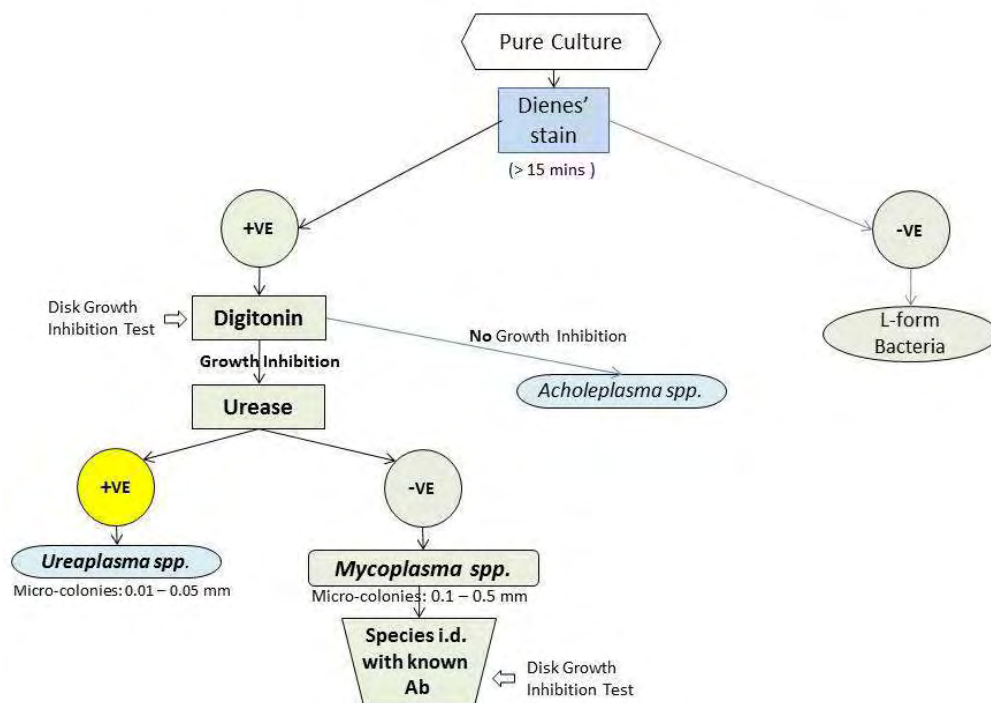
Το *U.urealyticum* και το *M.hominis* έχουν συσχετισθεί με ποικίλες λοιμώξεις αλλά επί της διεθνούς βιβλιογραφίας δεν υπάρχει ομοφωνία σχετικά με τον παθογενετικό τους ρόλο, δεδομένου ότι απομονώνονται αρκετά συχνά και στην χλωρίδα φυσιολογικών ατόμων. Πιο πιθανό είναι ότι δρουν ως ευκαιριακά παθογόνα. Το *U.urealyticum* και το *U.parvum* αποικίζουν τον κόλπο ασυμπτωματικών γυναικών σε ποσοστό 40 με 80% ενώ το *M.hominis* σε ποσοστό 21 με 53% [2]. Τα ποσοστά ανίχνευσής τους στην ουρήθρα ασυμπτωματικών ανδρών είναι λίγο χαμηλότερα. Ο αποικισμός εξαρτάται από την ηλικία, το φύλο, την σεξουαλική δραστηριότητα, τον αριθμό των σεξουαλικών συντρόφων και το ορμονικό προφίλ [3]. Ερευνητές από τις ΗΠΑ συσχέτισαν τον αποικισμό με χαμηλό κοινωνικό-οικονομικό επίπεδο, νεαρές ηλικίες, συχνή εναλλαγή πολλαπλών σεξουαλικών συντρόφων και χρήση αντισυλληπτικών χαπιών [4]. Η μη χρήση προφυλακτικού κατά την διάρκεια των σεξουαλικών επαφών σχετίζεται σαφώς με την μετάδοση των παθογόνων αυτών [3].

Στη χώρα μας τα επιδημιολογικά δεδομένα σχετικά με τον επιπολασμό των ουρογεννητικών λοιμώξεων από *Mycoplasma spp.* και *Ureaplasma spp.* παραμένουν πλημμελή, καθώς μελέτες για τον προσδιορισμό της συχνότητας ανίχνευσής τους πραγματοποιούνται κυρίως κατά την διάρκεια της τελευταίας δεκαετίας. Στην Βόρεια Ελλάδα οι Kotrotsiou et al., 2013, ανίχνευσαν το *Ureaplasma spp.* σε ασυμπτωματικές γυναίκες σε ποσοστό 16,13% ενώ στην Αθήνα οι Baka et al., 2009, ανίχνευσαν σε γυναίκες με χρόνια ουρηθρικά συμπτώματα το *U.urealyticum* σε ποσοστό 52,9% και το *M.hominis* σε ποσοστό 3,3% [5, 6, 7]. Για την περιοχή της Θεσσαλίας δεν υπάρχει κάποια ανάλογη μελέτη, γεγονός που συνέβαλε στην πραγματοποίηση της παρούσας εργασίας.

Σκοπός της εργασίας είναι ο προσδιορισμός της συχνότητας του μυκοπλάσματος και του ουρεοπλάσματος στο ουρογεννητικό σύστημα γυναικών κυρίως αναπαραγωγικής ηλικίας που προσήλθαν στα εξωτερικά ιατρεία της Γυναικολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας από την περιοχή της Θεσσαλίας σε περίοδο ενός οκταμήνου, Ιούνιος 2015 – Φεβρουάριος 2016. Η μελέτη εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου της Λάρισας κατά το έτος 2015 – 2016 υπό την επίβλεψη της Καθηγήτριας Μικροβιολογίας του Ιατρικού τμήματος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και Διευθύντριας του Μικροβιολογικού Εργαστηρίου του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας κ. Ευθυμίας Πετεινάκη. Η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε βασίστηκε στην μοριακή ανίχνευση και ταυτοποίηση των συγκεκριμένων παθογόνων άμεσα στο κλινικό δείγμα των γυναικών της μελέτης.

1.1 *Mycoplasma spp.* και *Ureaplasma spp.*

Class Mollicutes (excluding hemotrophic *Mycoplasma spp.*)



Εικόνα 1.: Ταξινόμηση mollicutes

Οι μικροοργανισμοί του γένους *Mycoplasma*, όπως επίσης και του γένους *Ureaplasma* ανήκουν στην ευρύτερη οικογένεια των *Mycoplasmataceae* και στην κλάση των *Mollicutes* που σημαίνει «μαλακόδερμα» από τις λατινικές λέξεις *Mollis* = μαλακός και *Cutis*= δέρμα και υποδηλώνουν την έλλειψη κυτταρικού τοιχώματος. Τα παθογόνα αυτά ανιχνεύονται πέρα από τον άνθρωπο, στα θηλαστικά, στα πτηνά, στα ψάρια και σε άλλα σπονδυλωτά καθώς και στα φυτά [7,8]. Οι μικροοργανισμοί της κλάσης των *Mollicutes*, δηλαδή τα μυκοπλάσματα, προέρχονται από προγονικά αναερόβια βακτήρια μετά από εξάλειψη γονιδίων.

Τα μυκοπλάσματα είναι οι μικρότεροι και απλούστεροι προκαρυωτικοί μικροοργανισμοί που μπορούν να πολλαπλασιάζονται μόνοι τους, διαθέτοντας βασική μονάχα βασική μεταβολική δραστηριότητα. Το μέγεθος του γενετικού υλικού είναι περίπου 600 Kb και ισοδυναμεί με το ένα έκτο του μεγέθους του γενετικού υλικού της *Escherichia coli*. Περιβάλλονται μόνο από τρίπτυχη κυτταροπλασματική μεμβράνη, ενώ διέπονται από πλήρη απουσία κυτταρικού τοιχώματος. Το κύτταρό τους περιέχει τα απολύτως απαραίτητα οργάνδια για την κυτταρική ανάπτυξη και αντιγραφή: μία μεμβράνη που διαχωρίζει το κυτταρόπλασμα από το εξωτερικό

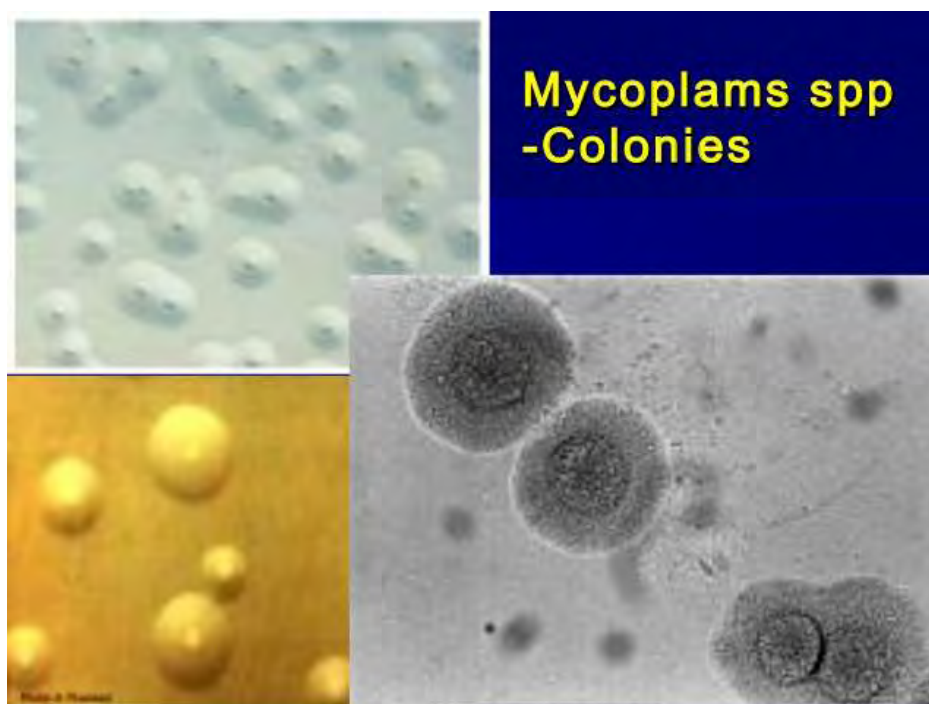
περιβάλλον, ριβοσώματα για τον σχηματισμό των πρωτεϊνών του και δίκλωνο δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ (DNA) που παρέχει τις πληροφορίες για την σύνθεση των πρωτεϊνών. Σε αντίθεση με τους υπόλοιπους προκαρυώτες, χαρακτηριστικό αυτών των οργανισμών είναι η έλλειψη του κυτταρικού τοιχώματος. Ανταυτού έχουν μία τρίστιβη κυτταροπλασματική ελαστική μεμβράνη [9]. Το κυρίαρχο σχήμα τους είναι σφαιρικό. Ωστόσο, πολλά μυκοπλάσματα παρουσιάζουν μία ποικιλία στη σχηματική μορφολογία τους από σφαιρικό, ωοειδές, φιαλοειδές μέχρι και νηματοειδές με εκβλαστήσεις [10]. Η ικανότητα να διατηρούν τέτοια σχήματα απουσία άκαμπτου κυτταρικού τοιχώματος φανέρωσε νωρίς την παρουσία κυτταροσκελετού [11]. Το γονιδίωμα τους είναι το τυπικό προκαρυωτικό αφού είναι κυκλικό, δίκλωνο DNA, αλλά διαφέρει από τους άλλους προκαρυώτες στο μέγεθος επειδή είναι πολύ μικρό και χαρακτηρίζεται από χαμηλό ποσοστό γουανίνης–κυτοσίνης (G+C) [12, 13].

Θρεπτικά υλικά, που στερούνται κυττάρων αποτελούν πρόσφορο έδαφος για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών αυτών και χαρακτηριστικά το κέντρο των αποικιών εμφανίζεται βαθιά ενσφηνωμένο μέσα στο στερεό θρεπτικό υλικό. Λόγω του μικρού μεγέθους του γενετικού τους υλικού, έχουν περιορισμένες βιοσυνθετικές ικανότητες και επομένως απαιτούν πλούσια θρεπτικά υλικά για την ανάπτυξη τους. Είναι χαρακτηριστική η ανάγκη τους σε στερόλη για να αναπτυχθούν και να πολλαπλασιαστούν. Το *M.genitalium* χρησιμοποιεί τη γλυκόζη, ενώ το *M.hominis* μεταβολίζει την αργινίνη. Το *U.urealyticum* χαρακτηριστικά υδρολύει την ουρία. Τα είδη *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* και *Ureaplasma parvum* σχετίζονται με λοιμώξεις του ουρογεννητικού συστήματος [7, 14].

Τα μυκοπλάσματα του γεννητικού συστήματος της γυναίκας αποικίζουν τους βλεννογόνους, το αιδοίο, τον κόλπο, τον τράχηλο και στους άνδρες την ουρήθρα. Επίσης, αποικίζουν το ορθό και τις πέριξ περιοχές αυτού [15].

Μελέτες που προέρχονται από διαφορετικά μέρη του κόσμου έχουν διαπιστώσει αύξηση των λοιμώξεων από τα γεννητικά μυκοπλάσματα και ουρεοπλάσματα την τελευταία δεκαετία [16]. Η συχνότητα ανίχνευσής τους διαφοροποιείται παγκοσμίως: 3,9-31% στο Μεξικό, 21,4% στις ΗΠΑ, 44,8% στην Κίνα και 54,9% στην Τουρκία [17, 18, 19, 20, 21, 22]. Ο αποικισμός εξαρτάται από πολυποίκιλους παράγοντες: το φύλο, την ηλικία, την σεξουαλική δραστηριότητα, τον αριθμό των σεξουαλικών συντρόφων, το ορμονικό προφίλ και τις κοινωνικό-οικονομικές συνθήκες που επικρατούν σε κάθε χώρα [9]. Στην Ελλάδα στοιχεία για την συχνότητα ανίχνευσης των γεννητικών μυκοπλάσμάτων και ουρεοπλάσμάτων είναι λίγα και προέρχονται από μελέτες που έγιναν την τελευταία δεκαετία. Στην Βόρεια Ελλάδα, ασυμπτωματικές γυναίκες φέρουν το *Ureaplasma spp.* σε ποσοστό 16,13%, εκ των οποίων στο 96,4% έγινε ανίχνευση του

U.parvum και στο 3,6% το *U.urealyticum* [5]. Το 2008 σε μελέτη που έλαβε χώρα στην Αθήνα, έγινε έλεγχος σε 369 γυναίκες με κολπίτιδα από τις οποίες οι 137 (37,1%) ήταν θετικές είτε στο *M.hominis*, είτε στο *U.urealyticum*, είτε και στα δύο μαζί, ενίοτε σε συνδυασμό με άλλους μικροοργανισμούς του γεννητικού συστήματος. Από τις 137 γυναίκες το 47,44% ήταν θετικό μόνο για *U.urealyticum*, το 0,72% μόνο για *M.hominis*, το 2,92% είχε και τα δύο, ενώ στο 48,90% συνυπήρχαν τα γεννητικά μυκοπλάσματα με άλλους μικροοργανισμούς [23]. Οι Baka *et al.*, το 2009 ανίχνευσαν σε γυναίκες με χρόνια ουρηθρικό σύνδρομο το *U.urealyticum* σε ποσοστό 52,9% και το *M.hominis* σε ποσοστό 3,3% [6]. Τέλος, οι Karanikolas *et al.*, 2009, ανίχνευσαν το *M.genitalium* σε ποσοστό 18% σε 150 γυναίκες. Καθίσταται σαφές, με βάση τα προαναφερθέντα δεδομένα της βιβλιογραφίας, ότι ο επιπολασμός των εν λόγω παθογόνων είναι υψηλός μέσα στον πληθυσμό, σε αμφότερα τα δύο φύλα.



Εικόνα 2.: Αποικίες Μυκοπλάσμάτων

Μυκοπλάσματα που ενοχοποιούνται για λοιμώξεις στο ουροποιογεννητικό σύστημα είναι το *M.genitalium* και το *M.hominis* ενώ από τα Ουρεοπλάσματα είναι το *U.urealyticum* και το *U.parvum*.

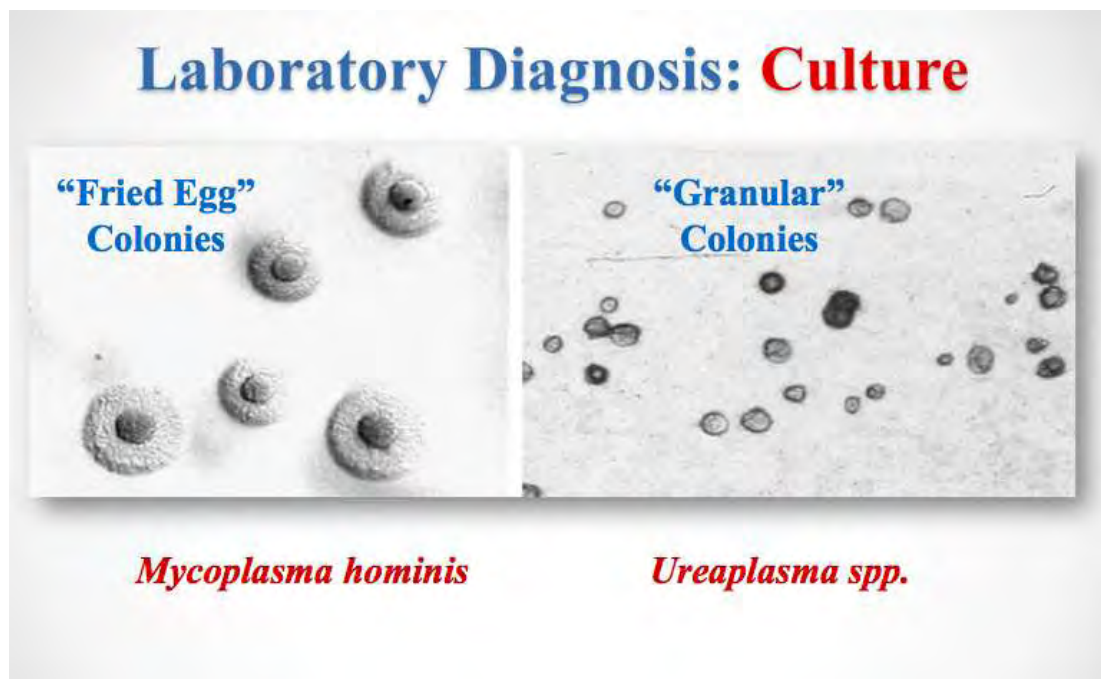
1.1.1 *Mycoplasma genitalium*

Ο μικροοργανισμός *M.genitalium* έχει τους γενικούς χαρακτήρες του γένους και διαφέρει από τα άλλα μυκοπλάσματα στους μορφολογικούς, καλλιεργητικούς και μεταβολικούς χαρακτήρες. Έχει το μικρότερο γονιδίωμα από όλα τα βακτήρια . Έχει απομονωθεί από άνδρες με ουρηθρίτιδα και γυναίκες με τραχηλίτιδα [24,25]. Έχει απομονωθεί μαζί με το μυκόπλασμα της πνευμονίας από τις εκκρίσεις του αναπνευστικού συστήματος σε μικρό αριθμό ατόμων, αλλά ο ρόλος του στις λοιμώξεις του αναπνευστικού συστήματος δεν έχει αποδειχθεί να είναι σημαντικός [26]. Αυτό αποτελεί ένα παθογόνο σεξουαλικά μεταδιδόμενο και όχι συμβιώντα μικροοργανισμό, ο οποίος μπορεί να προκαλέσει ουρηθρίτιδα στους άνδρες χωρίς όμως συσχέτισή του με την ανδρική υπογονιμότητα [27]. Στις γυναίκες από την άλλη, δύναται να εχοχοποιείται για βλεννοπυώδη τραχηλίτιδα. Η τελευταία, οδηγεί συχνά σε ασυμπτωματική ενδομητρίτιδα και πιθανόν λοίμωξη των σαλπίγγων με αποτέλεσμα σοβαρές μαιευτικές και γυναικολογικές επιπλοκές όπως έκτοπο κύηση ή στείρωση λόγω σαλπινγίτιδας. Ευθύνεται δε, και για πυελική φλεγμονώδη νόσο στις γυναίκες, η οποία και αυτή με τη σειρά της δύναται να προκαλέσει τις επιπλοκές που μόλις προαναφέρθηκαν, συμπεριλαμβανομένης και της βαριάς δυσμηνόρροιας καθώς και του Συνδρόμου χρονίου πυελικού άλγους στις γυναίκες.

Το *M.genitalium* έχει σχήμα φιαλοειδές με ένα λεπτό ραβδοειδές οργανίδιο στο ένα άκρο. Όσον αφορά τον κυτταροσκελετό του, οι Wasinger *et al.* είχαν προτείνει την ύπαρξη μίας πρωτεΐνης παρόμοιας με την τουμπουλίνη [28]. Το *M.genitalium* αποτελείται τουλάχιστον από επτά πρωτεΐνες, δύο από τις οποίες (η MgPa, 140 kDa [γνωστή ως MG191] και η P110 [γνωστή ως MG192]) είναι απαραίτητες για την προσκόλληση του μικροοργανισμού στις επιφάνειες των γυάλινων και πλαστικών δοχείων καλλιέργειάς του, καθώς και στα διάφορα ανθρώπινα και ζωικά κύτταρα σε συνεργασία με δύο άλλες πρωτεΐνες τις MG218 και MG317 [29,30]. Επίσης, η πρωτεΐνη MG191 εκτός από προσκολλητίνη είναι και πρωτεϊνικό αντιγόνο [31,32,33]. Όταν ένα στέλεχος *M.genitalium* έχει υποστεί μετάλλαξη που δεν του επιτρέπει να παράγει την MG191, τότε τα ερυθροκύτταρα δεν προσκολλώνται στις αποικίες του [34]. Συνεπώς, η MG191 είναι υψίστης σημασίας, εφόσον αποτελεί παράγοντα παθογονικότητας. Το μέγεθος του γονιδιώματός του είναι 580 kb, ενώ το ποσοστό γουανίνης-κυτοσίνης είναι 32% [35,36]. Θεωρείται ευρέως ως ο μικροοργανισμός με το μικρότερο γονιδίωμα από όλα τα βακτήρια που μπορεί να αναπτυχθεί σε δοκιμαστικό σωλήνα απουσία κυττάρων-ξενιστών [37]. Μεταβολίζει την γλυκόζη, αλλά όχι την αργινίνη και την ουρία [36, 38].

Όσον αφορά στον ρυθμό ανάπτυξης είναι ιδιαίτερα αργός (περίπου 30-50 ημέρες), αυξάνεται δε, μετά από επαναλαμβανόμενες ανακαλλιέργειες. Δεν αναπτύσσεται στα συνήθη θρεπτικά

υλικά της καλλιέργειας των μυκοπλάσμάτων, γιατί είναι ευαίσθητο στην παρουσία οξέϊκού θαλίου σε συγκεντρώσεις ανεκτές από τα άλλα μυκοπλάσματα. Αναπτύσσεται σε κύτταρα Vero, καθώς και σε SP4 άγαρ σε αναερόβιες συνθήκες με νάτριο, 5% CO₂ και θερμοκρασία 37°C [38]. Οι αποικίες που σχηματίζει είναι μικρές, βαθιά ριζωμένες στο υλικό και συχνά με περιφέρεια σαν «αυγά μάτια».



Εικόνα 3.: Χαρακτηριστικές εικόνες μορφολογίας καλλιιεργειών Μυκοπλάσματος - Ουρεοπλάσματος

Η ευαισθησία του *M.genitalium* αφορά τις τετρακυκλίνες, τις φθοροκινολόνες και τις μακρολίδες [36]. Επίσης, υψηλές συγκεντρώσεις πενικιλίνης G και αμφοτερικίνης B δρύνε ανασταλτικά στην ανάπτυξη άγριων στελεχών *M.genitalium*, ενώ σε συγκέντρωση 200 IU/ml πενικιλίνης και 500 µg/ml πολυμυκίνης τα αντιβιοτικά αυτά μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως εκλεκτικά αντιβιοτικά, ώστε να αποφευχθεί βακτηριακή υπερανάπτυξη σε καλλιέργειες κυττάρων Vero [39].

Οι Ευρωπαϊκές οδηγίες για τη θεραπεία της μη επιπλεγμένης λοίμωξης από το *M. genitalium* ορίζουν ότι θα πρέπει να αντιμετωπίζεται με δόση εφόδου αζιθρομυκίνης 500 mg την πρώτη ημέρα, έπειτα με 250 mg στις ημέρες 2-5 (από του στόματος) ή με δαζαμυκίνη 500 mg τρεις φορές ημερησίως για 10 ημέρες (από του στόματος). Η θεραπεία και η θεραπεία δεύτερης γραμμής για μη επιπλεγμένη μόλυνση ανθεκτικών σε μακρολίδες από το *M. genitalium* είναι η μοξιφλοξασίνη 400 mg για 7-10 ημέρες (από του στόματος). Ως θεραπεία τρίτης γραμμής μόνιμης μόλυνσης με *M. genitalium* μετά από αζιθρομυκίνη και μοξιφλοξασίνη, προτείνεται η

δοξυκυκλίνη 100 mg δύο φορές ημερησίως για 14 ημέρες και μπορεί να θεραπεύσει το 30% των περιστατικών. Η πριστιναμυκίνη 1 g τέσσερις φορές ημερησίως για 10 ημέρες (από του στόματος) εμφανίζει ίαση περίπου 90%. Η επιπλεγμένη μόλυνση από το *M. genitalium* (PID, επιδιδυμίτιδα) αντιμετωπίζεται με moxifloxacin 400 mg εκ του στόματος για 14 ημέρες [40].

Τα νοσήματα του ουρογεννητικού συστήματος που μπορεί να προκληθούν από το *M. genitalium* είναι ποικίλα σε άνδρες και γυναίκες. Το *M. genitalium* είναι το ενδέκατο είδος μυκοπλάσματος (σε χρονολογική σειρά) που απομονώθηκε στον άνθρωπο [38]. Απομονώθηκε πρώτη φορά το 1981 σε καλλιέργειες από δείγματα από την ουρήθρα δύο ανδρών που είχαν NGU [38]. Στους άνδρες ο μικροοργανισμός σχετίζεται με την μη γονοκοκκική ουρηθρίτιδα (NGU). Αν και το *M. genitalium* είχε προταθεί ως αιτία της μη γονοκοκκικής ουρηθρίτιδας στον άνθρωπο [38], η ακριβής εμπλοκή του στην αιτιοπαθογένεια της νόσου δεν είχε αποδειχθεί, δεδομένης της δυσκολίας που εμφάνιζε η απομόνωσή του από κλινικά δείγματα. Η χρήση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης διευκόλυνε την ανίχνευση του από κλινικά δείγματα και αποδείχτηκε σημαντική συσχέτιση μεταξύ του *M. genitalium* και της NGU [41, 42]. Σήμερα, έχει αποδειχθεί ότι το *M. genitalium* συσχετίζεται πιο στενά με την συμπτωματική NGU παρά με την ασυμπτωματική [42]. Το *M. genitalium* αναγνωρίζεται ως ένας ανεξάρτητος αιτιολογικός παράγοντας τόσο της οξείας, όσο και της χρόνιας μη γονοκοκκικής ουρηθρίτιδας στους άνδρες και είναι υπεύθυνο για το 20-35% των περιπτώσεων αυτών [43,44]. Επίσης, έρευνες στη βιβλιογραφία καταδεικνύουν ότι το *M. genitalium* μπορεί να εμπλέκεται με την επιδιδυμίτιδα στους άνδρες [45].

Στην αντίπερα όχθη, στο γυναικείο φύλο, υπάρχουν ενδείξεις συσχέτισης μεταξύ του *M. genitalium* και της μη γονοκοκκικής ουρηθρίτιδας [26, 46]. Επίσης, ο μικροοργανισμός συσχετίζεται και με την τραχηλίτιδα. Στην Ιαπωνία, το 1997, υπήρξε η πρώτη ένδειξη, όπου το *M. genitalium* ανιχνεύθηκε στον τράχηλο σε 5 γυναίκες από τις 57 με τραχηλίτιδα (9%) αλλά σε καμιά από τις 79 που δεν είχαν τραχηλίτιδα [47]. Πράγματι, σε μία πρόσφατη έρευνα το *M. genitalium* ήταν το μοναδικό μυκόπλασμα που θεωρήθηκε αιτία τραχηλίτιδας [48]. Μία ακόμα ασθένεια που φαίνεται να σχετίζεται με το *M. genitalium* είναι η οξεία πυελική φλεγμονή (PID), η οποία όπως και οι περισσότερες ασθένειες του ουρογεννητικού είναι πολυπαραγοντικής αιτιολογίας [49]. Η πρώτη φορά που αναφέρθηκε το *M. genitalium* ως πιθανή αιτία της PID ήταν το 1984 [50]. Από τότε, άλλες 5 εργασίες βασιζόμενες στην τεχνική της PCR βρήκαν θετική συσχέτιση μεταξύ του *M. genitalium* και των PID σε διαφορετικούς γεωγραφικούς πληθυσμούς παγκοσμίως [47,51,52,53]. Τέλος, το *M. genitalium* ενοχοποιείται και στα δύο φύλα για υπογονιμότητα [54].

1.1.2 *Mycoplasma hominis*

Το πρώτο μυκόπλασμα που απομονώθηκε από τον άνθρωπο το 1937 [55]. Είναι ένα ετερογενές μυκόπλασμα του ουρογεννητικού συστήματος και εντοπίζεται στα 2/3 των γυναικών με βακτηριακή κολπίτιδα (Bacterial Vaginosis-BV) [56]. Το *M.hominis* είναι ένα κοκκιοειδές, κοκκοβακτηριοειδές και νηματοειδές κύτταρο που αλλάζει μορφή και μέγεθος αυτομάτως γιατί κατέχει συσπαστικό-χαλαρωτικό μηχανισμό [9]. Το μέγεθος του γονιδιώματός του κυμαίνεται από 696 kb έως 825 kb [57]. Όσον αφορά τον ενεργειακό του μεταβολισμό, εξαρτάται από τη διάσπαση της αργινίνης, αλλά όχι της γλυκόζης και της ουρίας. Δεν ανάγει το τετραζόλιο και το κυανούν του μεθυλενίου. Έχει μεγάλη αντοχή στην ερυθρομυκίνη και στις κετολίδες αλλά παρουσιάζει ευαισθησία στην ζοσαμυκίνη [58, 59]. Επίσης, και οι φλουοροκινολόνες, όπως η Τροβαφλοξασίνη, δρουν εναντίον του *M.hominis* στοχεύοντας τα γονίδια των τοποϊσομερασών του [58].

Οι αποικίες του προσκολλούν κύτταρα HeLa και κύτταρα κυτταροκαλλιιεργειών εμβρύου όρνιθας. Ευνοϊκό pH για την ανάπτυξή τους είναι 5,5 με 8,0 ενώ ο χρόνος ανάπτυξης των αποικιών κυμαίνεται από 1 με 5 ημέρες. Η συχνότητα αποικισμού από το *M.hominis* κυμαίνεται από 0-45% και είναι υψηλότερη στις γυναίκες [9]. Διαθέτει τρία διαφορετικά αντιγόνα στην επιφάνειά του τα οποία έχουν χαρακτηριστεί λεπτομερώς. Τα δύο είναι πρωτεΐνες (135 kDa) οι οποίες ανήκουν στην οικογένεια πρωτεϊνών Lmp, οι Lmp1 και Lmp3 [57]. Το τρίτο αντιγόνο είναι μία λιποπρωτεΐνη η P120 η οποία συμμετέχει και στην προσκόλληση του μικροοργανισμού στα κύτταρα [60]. Βάσει των πρωτεϊνικών αντιγόνων έχουν διαχωρισθεί 7 ορότυποι.

Ο μικροοργανισμός *M.hominis* συχνότερα εντοπίζεται στο κατώτερο γεννητικό σύστημα, φαίνεται να σχετίζεται με ανδρική υπογονιμότητα σε ασυμπτωματικούς ασθενείς [61,62]. Επίσης, έχει απομονωθεί από το ανώτερο γεννητικό σύστημα μόνο όταν έχουν υπάρξει συμπτώματα οξείας λοίμωξης, συχνά σε συνδυασμό με την ύπαρξη συγκεκριμένης αντιγονικής απάντησης [63]. Επίσης, παραμένει άγνωστος ο ρόλος του *M.hominis* στην στειρότητα ως απότοκο σαλπινγικής φλεγμονής. Ωστόσο, είναι λογικό να θεωρείται ότι ο μικροοργανισμός μπορεί να διαδραματίζει κάποιο ρόλο και στην στειρότητα, εφόσον έχει απομονωθεί με τριπλάσια συχνότητα από στείρες γυναίκες με PID σε σχέση με τους μάρτυρες (φυσιολογικές γυναίκες) [64]. Ο μικροοργανισμός *M.hominis* ενοχοποιείται για την εμφάνιση κολπίτιδας. Υπάρχει στον κόλπο στα 2/3 των γυναικών και περισσότερο σε αυτές με ανώμαλα κολπικά ευρήματα (ερυθρότης, εύθρυπτο τοίχωμα, κολπικές εκκρίσεις), σε σύγκριση με το 10% των γυναικών χωρίς ευρήματα. Επίσης έχουν βρεθεί υψηλά ποσοστά IgG αντισωμάτων για τον μικροοργανισμό σε γυναίκες με κολπίτιδα [56].

Η φλεγμονώδης νόσος της πυέλου (PID) είναι μία ασθένεια που οφείλεται σε πολλούς παράγοντες, όπως έχει αναφερθεί ήδη και παραπάνω. Φαίνεται ότι μπορεί να οφείλεται και στο *M.hominis*, αφού έχει απομονωθεί από το ενδομήτριο και από τις σάλπιγγες από το 10% γυναικών με σαλπιγγίτιδα, ένα εύρημα που συνοδεύεται από συγκεκριμένη αντιγονική απάντηση [65]. Το *M.hominis* απομονώνεται από το αίμα γυναικών με πυρετό μετά από έκτρωση (σηπτική αποβολή) ή μετά από φυσιολογικό τοκετό και σχετίζεται με πνευμονία, αρθρίτιδα, ενδομητρίτιδα και λοίμωξη καισαρικής τομής μετά τον τοκετό, σύμφωνα με σποραδικές αναφορές στη διεθνή βιβλιογραφία. Περαιτέρω, απομονώνεται από το αμνιακό υγρό, από το αίμα του ομφάλιου λώρου, από το αίμα των νεογνών και περιστασιακά έχει σχετισθεί με χοριοαμνιονίτιδα, αποβολή εμβρύου, εμβρυικό θάνατο και πρόωρο τοκετό, πολυάριθμες δηλαδή, μαιευτικές επιπλοκές. Επειδή όμως συνήθως απομονώνεται μαζί με το *U.urealyticum* είναι πολύ δύσκολο να αποδειχθεί αν το *M.hominis* είναι αυτό καθεαυτό υπεύθυνο για τις προαναφερθείσες επιπλοκές [66].

1.1.3 *Ureaplasma urealyticum* και *Ureaplasma parvum*

Οι μικροοργανισμοί *U.urealyticum* (UUR) και *U.parvum* (UPA) ανήκουν στο γένος *Ureaplasma*. Το γένος αυτό πρώτη φορά περιγράφηκε το 1954, ενώ η επίσημη του ταξινόμηση στα μυκοπλάσματα έγινε το 1974 [67]. Αρχικά επικρατούσε η άποψη ότι οι δύο μικροοργανισμοί ήταν δύο διαφορετικοί υπότυποι του *U.urealyticum* (biovar 1 και biovar 2).

Οι Kong *et al.* κάνοντας φυλογενετική ανάλυση πρότειναν την ίδρυση ενός καινούριου είδους του *U.parvum* (biovar 1) [68]. Και οι δύο μικροοργανισμοί έχουν τους γενικούς μορφολογικούς και καλλιεργητικούς χαρακτήρες των *Mycoplasma*, αλλά έχουν ένα ιδιαίτερο μεταβολικό δείκτη, ότι όλα τα στελέχη τους υδρολύουν την ουρία [67]. Επίσης δεν μεταβολίζουν σάκχαρα και αργινίνη, δεν ανάγουν το τετραζόλιο και παράγουν φωσφατάση.

Δεν έχουν κυτταρικό τοίχωμα όπως τα μυκοπλάσματα, αλλά περιβάλλονται από μία μεμβράνη από την οποία προβάλλουν ινδοειδείς προσεκβολές. Ευνοϊκό pH για την ανάπτυξή τους είναι 6 με 6,5 [67]. Αναπτύσσονται στα θρεπτικά υλικά των μυκοπλασμάτων αλλά οι αποικίες τους δεν έχουν απλωτή περιφέρεια και είναι πολύ μικρές (15-25μm). Ο χρόνος ανάπτυξης των αποικιών κυμαίνεται από 1 με 4 ημέρες.

Μπορούν και προσκολλούν σε μία ποικιλία κυττάρων όπως τα επιθηλιακά κύτταρα της ουρήθρας, τα σπερματοζώαρια και τα ερυθροκύτταρα [69]. Η προσκόλληση γίνεται με τη βοήθεια πρωτεϊνών οι οποίες εκφράζονται στην επιφάνεια του κυττάρου τους [70].



Εικόνα 4.: Ικανότητα προσκόλλησης ουρεοπλάσματος

Μία μεγάλη οικογένεια πρωτεϊνών της επιφάνειάς τους είναι οι MBA, οι οποίες είναι και πρωτεϊνικά αντιγόνα και έχουν χρησιμοποιηθεί στην ανάπτυξη αντιδραστηρίων για την διάγνωση και στον διαχωρισμό των ορότυπων [68]. Για το *U.urealyticum* έχουν διαχωριστεί 10 ορότυποι (UUR2, UUR4, UUR5, UUR7-13) [71], ενώ για το *U.parvum* έχουν καθοριστεί 4 ορότυποι (UPA1, UPA3, UPA6, UPA14) [68]. Μελέτες που έγιναν με σκοπό τη διερεύνηση της σύνδεσης ειδικών ορότυπων με τοξικότητα και δημιουργία νόσου, έδωσαν αντικρουόμενα αποτελέσματα. Σύμφωνα με μελέτη των Quinn, ο ορότυπος 4 απομονώνεται πιο συχνά από γυναίκες με σύνδρομο καθέξιν αποβολών (RPL-Reccurent pregnancy loss). Άλλοι ερευνητές απομόνωσαν τον ορότυπο 4 πιο συχνά σε άνδρες με ουρηθρίτιδα και στον τράχηλο γυναικών με φλεγμονώδη νόσο της πυέλου. Ο ορότυπος 3 φαίνεται να είναι ο πιο συχνός ορότυπος που απομονώνεται από γυναίκες, ανεξάρτητα από τον πληθυσμό που εξετάζεται και τη γεωγραφική θέση. Αρκετοί ορότυποι είναι επιθετικοί και πιθανόν η αντιγονική μεταβλητότητά τους, καθώς και παράγοντες του ξενιστή, μπορεί να είναι πιο καθοριστικοί για τη δημιουργία λοιμώξεων από *U.urealyticum*, από ότι οι διαφορετικοί ορότυποι.

Οι δύο μικροοργανισμοί παρουσιάζουν γενικά ευαισθησία στα μακρολίδια και στις φλουοροκινολόνες [72, 73], ενώ είναι ανθεκτικοί στις τετρακυκλίνες, καθώς και στην

πενικιλίνη και στις κεφαλοσπορίνες, αφού στερούνται κυτταρικού τοιχώματος [73,74]. Επίσης, το *U.urealyticum* παρουσιάζει ευαισθησία στα αντιβιοτικά εβερνιμυκίνη, κουνινοπριστίνη/δαλφοπριστίνη και τελιθρομυκίνη [73]. Ο μικροοργανισμός *U.parvum* σε πρόσφατη έρευνα που έγινε για πρώτη φορά και αφορούσε τις γυναίκες της Νότιας Αφρικής, έδειξε σε ορισμένες περιπτώσεις ανθεκτικότητα στις κινολόνες, στην ερυθρομυκίνη και στην αζιθρομυκίνη που οφείλεται σε μεταλλάξεις γονιδίων [75].

Τα δύο είδη ουρεοπλάσματος μπορούν να απομονωθούν ξεχωριστά ή και μαζί από κλινικά δείγματα. Σχηματίζουν συμβιωτικές αποικίες στο ουρογεννητικό σύστημα σε υγιείς ανθρώπους, αλλά εμπλέκονται και σε λοιμώξεις. Το *U.urealyticum* εμφανίζεται πολύ συχνά σε υγιή, ασυμπτωματικά άτομα, ενώ νόσος δημιουργείται μόνο σε έναν υποπληθυσμό των ατόμων που προσβάλλονται. Αυτό οδήγησε στην υπόθεση, ότι μόνο συγκεκριμένες υποομάδες του είδους μπορεί να είναι παθογόνες, και να σχετίζονται πραγματικά με νόσο [76]. Το *U.urealyticum* στους άνδρες προκαλεί μη γονοκοκκική ουρηθρίτιδα (NGU), προστατίτιδα και επιδιδυμίτιδα. Συχνά συνυπάρχει με λοίμωξη από *C.trachomatis* (Χλαμμύδια). Στις γυναίκες προκαλεί κολπίτιδα, τραχηλίτιδα, ενδομητρίτιδα, απομονώνεται από φλεγμαίνουσες σάλπιγγες, συσχετίζεται με ουρηθρικό σύνδρομο, πυελική φλεγμονώδη νόσο (PID) και περιγεννητικές επιπλοκές (PPROM, πρόωρος τοκετός) [1]. Επίσης υπάρχει σημαντική συσχέτιση του μικροοργανισμού με πυελονεφρίτιδα και λιθίαση του ουροποιητικού [77].

Στην Ελλάδα, πρόσφατες έρευνες αναφέρουν ότι το 47,44% των ασθενών με συμπτώματα κολπίτιδας και το 52,9% των γυναικών με χρόνια ουρηθρικό σύνδρομο ήταν θετικές στο *U.urealyticum* [7,23].

Επίσης, έχει αποδειχθεί ότι η παρουσία του *U.urealyticum* μεταξύ ανδρών με μη γονοκοκκική ουρηθρίτιδα είναι υψηλότερη από ότι μεταξύ ανδρών χωρίς NGU. Γι' αυτό, το *U.urealyticum* ίσως να παίζει σημαντικό ρόλο στην αιτιολογία της NGU [78]. Λόγω της φορίας του στην ουρήθρα, η συσχέτισή του με τη μη γονοκοκκική ουρηθρίτιδα άργησε να εδραιωθεί, μετά την πρώτη περιγραφή από τον Shepard το έτος 1954. Ακολούθησαν αρκετές μελέτες με αντικρουόμενα αποτελέσματα μέχρι να επιβεβαιωθούν τα αξιώματα του Koch [79]. Σύμφωνα με τους Deguchi *et al.*, 2004, το ποσοστό των ανδρών-φορέων σε έδαφος ουρήθρας του *U.urealyticum* κυμαίνεται μεταξύ του 7,8-13,5% [97]. Το παθογόνο επίσης, απομονώνεται σε χαμηλές συγκεντρώσεις στο 28,2% των δειγμάτων σπέρματος, αλλά η παρουσία του δεν σχετίζεται με την ηλικία των ανδρών και την κλινική σημειολογία. Σύμφωνα με τη μελέτη των Takahashi *et al.*, 2006, στην Ιαπωνία, τα ποσοστά ανίχνευσης του μικροοργανισμού στα ούρα ασυμπτωματικών ανδρών συσχετίζονται με τη σεξουαλική δραστηριότητα και ανέρχονται στο

12% για το είδος *U.urealyticum* και στο 23% για το *U.parvum*. Ο λόγος για τον οποίο τα ουρεοπλάσματα σε κάποιες περιπτώσεις είναι συμβιωτικοί μικροοργανισμοί και σε άλλες προκαλούν ασθένειες είναι ακόμα άγνωστος, αλλά είναι πιθανόν να σχετίζεται με την λοιμογόνο ικανότητα των μικροοργανισμών, το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή και το κατά πόσο ευάλωτο ή όχι είναι αυτό, ή με τοπικούς παράγοντες του γεννητικού συστήματος [80]. Υποψίες ότι συγκεκριμένα είδη ή ορότυποι των ουρεοπλάσμάτων συνδέονται με συγκεκριμένες ασθένειες καθιστούν αναγκαίες τις έρευνες για να αναπτυχθούν μέθοδοι με τις οποίες θα προσδιορίζεται ο ορότυπος σε κάθε ασθενή.

Το πεδίο της γυναικείας υπογονιμότητας και η συσχέτιση του *Ureaplasma spp.* στην παθογένεια αυτού, αποτελεί πεδίο αμφισβήτησης επί της διεθνούς βιβλιογραφίας, εφόσον έρευνες που έχουν διεξαχθεί μέχρι σήμερα δεν έχουν καταλήξει σε οριστικά συμπεράσματα, καθώς τα αποτελέσματα είναι αντιφατικά. Ωστόσο, θα πρέπει να σημειωθεί ότι ο μικροοργανισμός ανευρίσκεται συχνότερα σε υπογόνιμες γυναίκες και ότι στις γυναίκες αυτές η αποτελεσματικότητα των μεθόδων τεχνητής γονιμοποίησης μειώνεται [81]. Γίνεται λόγος μάλιστα, για πιθανή συσχέτιση του παθογόνου με το τις επανειλημμένες αποτυχίες εμφύτευσης στην εξωσωματική γονιμοποίηση. (RIF-Reccurent Implantation Failure). Η σχέση γονιμότητας και φορίας του *Ureaplasma spp.* στο γεννητικό σύστημα του άρρενος δεν είναι απόλυτα διευκρινισμένη. Από παλαιότερη μελέτη που έγινε στην Ελλάδα σε ασυμπτωματικούς άνδρες, φαίνεται ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση της ανεύρεσης του μικροοργανισμού με παθολογικά ευρήματα στο σπέρμα [82]. Ωστόσο, υπήρχε σημαντική σχέση μεταξύ του *U. urealyticum* και της ανδρικής στειρότητας σε μελέτη που διεξήχθη στην Κίνα [83].

1.2 Εργαστηριακές μέθοδοι ανίχνευσης και διάγνωσης Μυκοπλασμάτων

Η σύγχρονη αναγνωρισμένη μέθοδος απομόνωσης των μυκοπλασμάτων είναι η καλλιέργεια σε στερεό θρεπτικό υλικό (άγαρ) και σε υγρό καλλιέργημα, ενώ η ταυτοποίηση τους μπορεί να επιτευχθεί με ορολογικές και γενετικές μεθόδους. Η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης έχει το πλεονέκτημα ότι επιτρέπει την ανίχνευση των μυκοπλασμάτων στόχων σε κλινικά δείγματα, χωρίς την ανάγκη για καλλιέργεια των μικροοργανισμών .

Η καλλιέργεια των μυκοπλασμάτων που απομονώνονται από τον άνθρωπο, εφαρμόζεται σε μικρό αριθμό διαγνωστικών εργαστηρίων. Αν και στο εμπόριο κυκλοφορούν έτοιμα υλικά, δεν έχουν βελτιώσει τη γενική χρήση των καλλιεργητικών μεθόδων, που παραμένουν περισσότερο τέχνη παρά επιστήμη. Από τη στιγμή που οι μοριακές τεχνικές ανίχνευσης των μυκοπλασμάτων

θα καθιερωθούν σταθερά και θα επιβεβαιωθεί η σημασία τους, είναι πιθανόν να αντικαταστήσουν τις περισσότερες μεθόδους καλλιέργειας.

1.2.1 Καλλιέργεια Μυκοπλασμάτων

Ο ορισμός της καλλιέργειας συνίσταται στον εμβολιασμό του κλινικού δείγματος στην επιφάνεια θρεπτικού υλικού σε τρυβλίο για απομόνωση μικροοργανισμών, με στόχο την απομόνωση αυτών. Η επώαση των καλλιεργημάτων γίνεται σε κλίβανο θερμοκρασίας 35⁰-37⁰C για 18-24 ώρες, ενώ για μικροοργανισμούς με βραδύ χρόνο αναπτύξεως, όπως είναι τα μυκοβακτηρίδια, η επώαση διαρκεί πολλές ημέρες ή εβδομάδες.

Η διενέργεια καλλιέργειας ενός κλινικού δείγματος με στόχο την απομόνωση και ταυτοποίηση του παθογόνου αιτίου της λοίμωξης είναι η βασικότερη πράξη που λαμβάνει χώρα στο περιβάλλον του εργαστηρίου, όπως ανιχνευθεί ο λοιμογόνος παράγοντας και προκειμένου για την εφαρμογή κατάλληλης αντιμικροβιακής θεραπείας.

Ο κλινικός ιατρός οφείλει να διέπεται από άριστη γνώση της θεωρίας αλλά και των εργαστηριακών πράξεων επί του συγκεκριμένου γνωστικού πεδίου, όπως είναι ο τρόπος λήψεως και μεταφοράς του κλινικού δείγματος στο εργαστήριο που εξασφαλίζει την καταλληλότητα του δείγματος, η επιλογή των θρεπτικών υλικών όπου το δείγμα θα καλλιεργηθεί (κοινής και ειδικής χρήσεως), η εφαρμογή των απαραίτητων ποιοτικών ελέγχων και γενικά η τήρηση των βασικών κανόνων των τεχνικών της καλλιέργειας, με πρότυπο την τεχνική της πρωτοκαλλιέργειας [9]. Η γνώση όλων των προαναφερθέντων στοιχείων, θα καθορίσει την επιτυχή αναγνώριση και απομόνωση των λοιμογόνων παραγόντων και την κατάλληλη εφαρμογή θεραπείας που απαιτείται για την αντιμετώπιση των λοιμώξεων που αυτοί προκαλούν.

Οι τεχνικές μέθοδοι που οδηγούν στην ταυτοποίηση του λοιμογόνου παράγοντα που αναπτύχθηκε στα θρεπτικά υλικά πρωτοκαλλιέργειας κλινικού ή άλλου υλικού είναι οι ακόλουθες:

- 1.Μακροσκοπική εξέταση των αποικιών, όσον αφορά στην μορφολογία αυτών και των μεταβολών στο θρεπτικό υλικό για εντόπιση αποικίας πιθανώς παθογόνου ή ζητούμενου μικροοργανισμού.
- 2.Εξέταση στο μικροσκόπιο από τον κλινικό, της μορφολογίας του παθογόνου μικροοργανισμού και της συμπεριφοράς του ως προς τη χρώση κατά Gram.

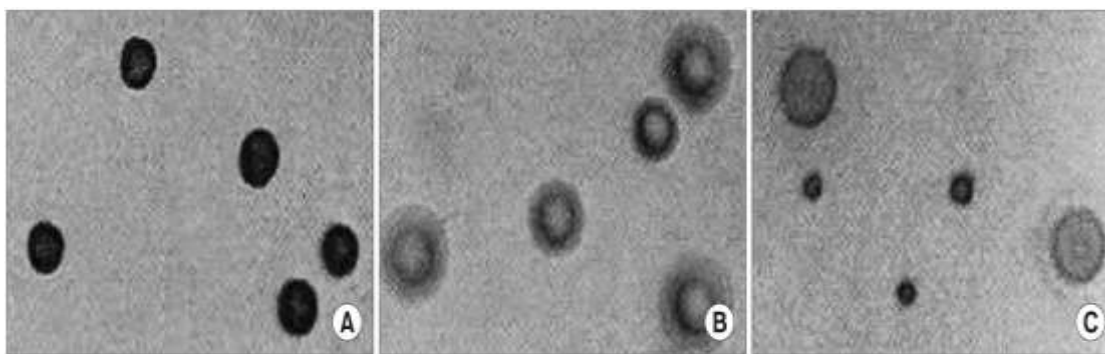
3. Αναγνώριση της ύποπτης αποικίας και ανακαλλιέργεια αυτής στην επιφάνεια ενός εκλεκτικού και ενός μη-εκλεκτικού θρεπτικού υλικού με χρήση της τεχνικής αραιώσεως επάνω στο άγαρ, προκειμένου να ληφθούν μεμονωμένες αποικίες και διαχωρισμός των ζητούμενων αποικιών από τυχόν συνυπάρχοντες άλλους μικροοργανισμούς.
4. Οι προκύπτουσες μεμονωμένες αποικίες θα αποτελέσουν το υλικό για τις ταυτοποιητικές δοκιμές.

Βέβαια η μέθοδος της καλλιέργειας που επιλέγεται εναπόκειται σε περιορισμούς οι οποίοι δυσκολεύουν πολύ την διάγνωση. Συγκεκριμένα, υφίστανται μικροοργανισμοί οι οποίοι εμπλέκονται σε σοβαρές ασθένειες και αναπτύσσονται βραδέως, ενώ ο κλινικός έχει ανάγκη την ταχύτατη διάγνωση της νόσου, προς την έγκαιρη επίτευξη της κατάλληλης θεραπευτικής παρέμβασης.

Το βακτήριο *Mycobacterium tuberculosis* που ευθύνεται για την φυματίωση, αποτελεί παράδειγμα των προαναφερθέντων [27]. Άλλοι μικροοργανισμοί όπως η *Kingella kingae*, έχουν μεγάλες θρεπτικές απαιτήσεις και δεν αναπτύσσονται στα κοινά θρεπτικά υποστρώματα [84]. Σε πολλές περιπτώσεις δε, η απομόνωση του παθογόνου αιτίου είναι ανέφικτη, λόγω του ότι έχει χορηγηθεί εμπειρική αντιμικροβιακή θεραπεία από τους κλινικούς ιατρούς, ενώ τέλος, με τις καλλιέργειες, η διάγνωση των λοιμώξεων που οφείλονται σε ιογενείς παράγοντες δεν είναι δυνατόν να επιτευχθεί.

Τα παθογόνα *Mycoplasma* και *Ureaplasma* μπορούν να καλλιεργηθούν και να αναπτυχθούν σε τεχνητά θρεπτικά υλικά, υγρά και στερεά. Έχουν αυστηρές διατροφικές ανάγκες, ιδιαίτερα σε λιπίδια, που τα χρειάζονται για την σύνθεση της κυτταροπλασματικής τους μεμβράνης.

Το κατεξοχήν στερεό θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιείται για την καλλιέργειά τους είναι το Άγαρ Α7. Περιέχει ζωμό τρυπτικής και σόγιας, 0,015% αστέρα θεικού μαγγανίου, ορό ίππου, εκχύλισμα μαγιάς, υδροχλωρική L-κυστεΐνη, 0,1% ουρία και πενικιλίνη, σε pH 6.0 [85]. Αφού το δείγμα ενοφθαλμιστεί στο θρεπτικό υλικό, επωάζεται σε κλίβανο για 48 ώρες στους 36⁰C με 10% CO₂. Το καλλιέργημα ελέγχεται για αποικίες με το οπτικό μικροσκόπιο με ξηρό φακό 10x σε 2-4 ημέρες. Για το *Mycoplasma* οι αποικίες είναι μικρές, άχρωμες και έχουν συχνά περιφέρεια σαν «αυγά μάτια». Για το *Ureaplasma* οι αποικίες έχουν χρώμα σκούρο και είναι διαφόρου μεγέθους, στρογγυλές και κοκκώδεις και περιγράφονται «σαν αχινός» ή «σαν κουβάρι». Το σκούρο καφεοειδές τους χρώμα οφείλεται στο διοξείδιο του μαγγανίου που προκύπτει από την αντίδραση του εστέρα του θεικού μαγγανίου με την αμμωνία.



Εικόνα 5. (Α) Μικροσκοπική εικόνα *Ureaplasma urealyticum* σε άγαρ Α7. (Β) Μικροσκοπική εικόνα *Mycoplasma hominis* σε άγαρ Α7. (C) Μικροσκοπική εικόνα και των δύο σε άγαρ Α7.

1.2.2 Διαθέσιμες δοκιμασίες ανίχνευσης Μυκοπλασμάτων στο εμπόριο

Στο εμπόριο κυκλοφορούν τυποποιημένες μέθοδοι ανίχνευσης του μικροοργανισμού, καθώς και προσδιορισμού της ευαισθησίας του. Οι μέθοδοι αυτές είναι πρακτικές και εύκολες στη χρήση τους και χαρακτηρίζονται από το στοιχείο της επαναληψιμότητας. Αποτελούνται από μικρά έτοιμα kit με θυρίδες που περιέχουν εκλεκτικό καλλιεργητικό ζωμό για την ανάπτυξη του μικροοργανισμού όταν βρίσκεται σε υψηλή συγκέντρωση ($\geq 10^4$ CFU/ml), καθώς και τα αντιμικροβιακά φάρμακα σε λυοφιλοποιημένη μορφή, το καθένα σε δύο συγκεντρώσεις, με όρια ευαισθησίας που χρησιμοποιούνται για τους κοινούς μικροοργανισμούς, χαρακτηρίζοντας το υπό μελέτη στέλεχος ως ευαίσθητο, μετρίως ευαίσθητο ή ανθεκτικό. Τα αποτελέσματα είναι συγκρίσιμα με αυτά των πρότυπων μεθόδων προσδιορισμού της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης αντιβιοτικού (MIC).

Πλεονέκτημα των εμπορικών kit είναι η δυνατότητα που παρέχουν στον έλεγχο μεμονωμένων στελεχών με απλή και γρήγορη εφαρμογή στην καθημέρα κλινική πράξη στο εργαστήριο. Ο παράγων «χειριστής» και οι γνώσεις ή οι δεξιότητές του, παρεμβάλλονται λιγότερο στο αποτέλεσμα σε σχέση με τις μεθόδους αναφοράς που απαιτούν έμπειρο τεχνικά προσωπικό, εφόσον οι συγκεντρώσεις των φαρμάκων και οι αναλογίες των υποστρωμάτων των «θυρίδων» είναι προκαθορισμένες και έτοιμες προς χρήση.

Στην σύγχρονη εποχή, υπάρχουν αρκετές εμπορικές δοκιμασίες με τις οποίες μπορεί να γίνει ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των μικροοργανισμών *Mycoplasma spp.* και *Ureaplasma spp.* καθώς και εξέταση της ευαισθησίας τους σε μία σειρά αντιβιοτικών (*Mycoplasma* IST 2 (Biomerieux), *Mycoplasma* IES (Autobio Diagnostics), *Mycoplasma* GU Screen (Bioplus)).



Εικόνα 6.: Mycoplasma IES-kit (Autobio Diagnostics)

1.2.3 Ορολογικές δοκιμασίες

Οι ορολογικές δοκιμασίες βασίζονται στην αντίδραση αντιγόνων-αντισωμάτων. Πραγματοποιούνται, είτε για διαγνωστικούς σκοπούς, είτε για την εκτίμηση του βαθμού ανοσίας ατόμων ή ομάδας ατόμων προς μια επιδημική ή ενδημική ή νοσοκομειακή νόσο κατόπιν αφανών λοιμώξεων και εμβολιασμών. Οι ορολογικές δοκιμές χρησιμοποιούνται, επίσης, για την αναζήτηση και ταυτοποίηση μικροβιακών αντιγόνων εφόσον διαθέτουμε τα αντισώματα.

Η βασική αρχή όλων των ορολογικών δοκιμών είναι η ένωση του αντιγόνου με το αντίσωμα και η βασική αρχή κάθε μιας από τις ποικίλες ορολογικές εξετάσεις είναι να κάνει ορατό το αποτέλεσμα της ενώσεως αυτής, αυξάνοντας ταυτόχρονα την ευαισθησία και την ειδικότητα της μεθόδου. Το αντιγόνο μπορεί να είναι ολόκληρο το μικροβιακό κύτταρο ή να είναι ουσίες του κυτταρικού τοιχώματος ή ουσίες που παράγει και εκκρίνει ο μικροοργανισμός, όπως είναι οι τοξίνες και τα ένζυμά του. Το αντίσωμα από την άλλη μεριά είναι πάντα μια ανοσοσφαιρίνη (IgM, IgG) [9].

Ο ορολογικός έλεγχος τώρα, για το *Mycoplasma* και το *Ureaplasma* δεν εμφανίζει ιδιαίτερη διαγνωστική αξία, αφού τα αντισώματα υπάρχουν και σε φορείς που δεν νοσούν, ενώ τετραπλασιασμός του τίτλου τους δεν διαπιστώνεται σε καμία περίπτωση [9].

1.2.4 Μοριακές μέθοδοι

A. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης- (PCR- Polymerase Chain Reaction)

Η Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR) αποτελεί την πιο διαδεδομένη και πιο σημαντική μοριακή μέθοδο ανίχνευσης των λοιμώξεων από *Mycoplasma* και *Ureaplasma*. Περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1983 από τον Kary Banks Mullis και εφαρμόζεται ευρέως για σκοπούς διαγνωστικούς ή μοριακής επιδημιολογίας [86]. Πρόκειται για μία *in vitro* τεχνική, με τη βοήθεια της οποίας είναι εφικτός ο ταχύς πολλαπλασιασμός συγκεκριμένων τμημάτων DNA. Για τον πολλαπλασιασμό αυτόν είναι απαραίτητοι δύο «εκκινητές» (primers- συνθετικές ολιγονουκλεοτιδικές αφετηρίες), οι οποίοι είναι μικρά μονόκλωνα μόρια DNA, που είναι συμπληρωματικά ως προς τις πλευρικές αλληλουχίες του DNA-στόχου.

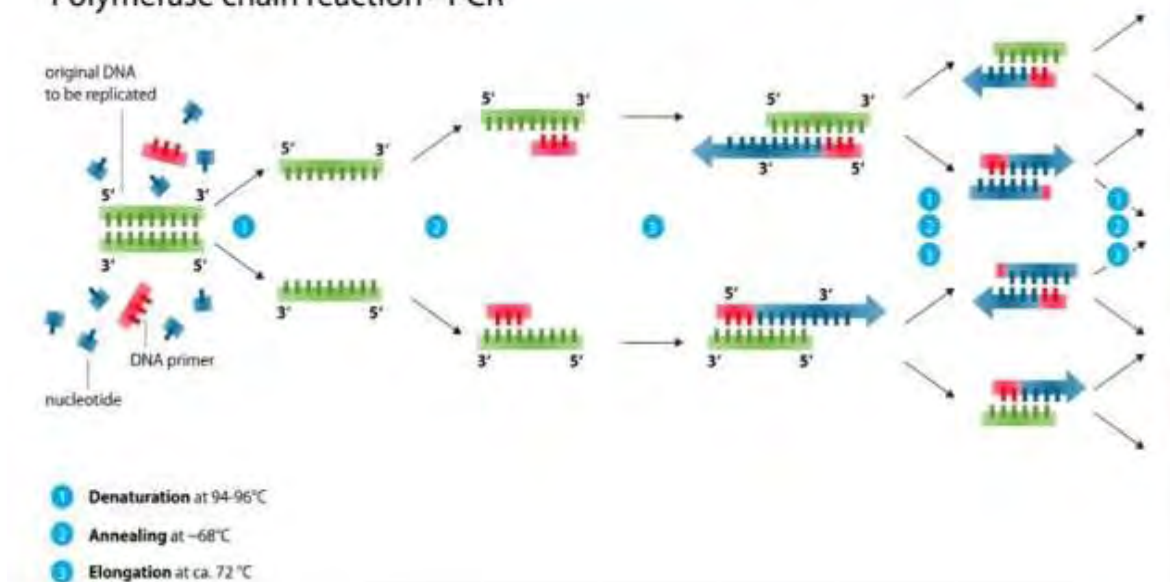
Η PCR αποτελείται από πολλαπλές κυκλικές επαναλήψεις, κάθε μία από τις οποίες περιλαμβάνει 3 στάδια (εικόνα 2).

1. **Αποδιάταξη** και διαχωρισμός της διπλής αλυσίδας του DNA σε υψηλή θερμοκρασία (94-96°C) (denaturation).
2. **Σύνδεση** των ολιγονουκλεοτιδικών αλληλουχιών (primers) με τις συμπληρωματικές περιοχές τους, επί του DNA-στόχου σε χαμηλότερη θερμοκρασία (annealing).
3. **Επιμήκυνση** των 3' άκρων των ολιγονουκλεοτιδίων με τη βοήθεια της θερμοανθεκτικής DNA –Taq- Πολυμεράσης (Taq πολυμεράση) και σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας στους 72°C (extension).

STAGES



Polymerase chain reaction - PCR



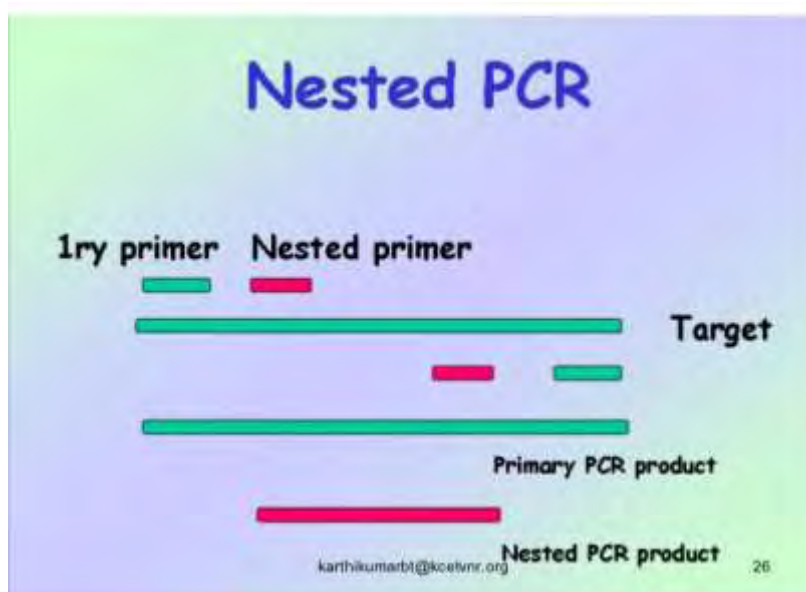
Εικόνα 7.: Σχηματική απεικόνιση σταδίων PCR

Η σύνθεση του νέου DNA γίνεται με κατεύθυνση 5'- 3' και το μέγεθος του προϊόντος ποικίλλει. Στο τέλος του πρώτου κύκλου ολοκληρώνεται η σύνθεση των 4 αλυσίδων του DNA, οι οποίες θα αποτελέσουν τα πρότυπα για την σύνθεση των νέων αλυσίδων στον δεύτερο κύκλο κ.ο.κ. Με αυτόν τον τρόπο πραγματοποιείται ο πολλαπλασιασμός του DNA-στόχου 2^n , όπου n είναι ο αριθμός των κύκλων. Τις περισσότερες φορές η αντίδραση ολοκληρώνεται μέσα σε 2-3 ώρες και περιλαμβάνει 20-30 κύκλους.

Τα πλεονεκτήματα της μεθόδου της PCR έναντι των κλασικών μεθόδων είναι ότι για την ανίχνευση των μικροοργανισμών δεν είναι απαραίτητο οι μικροοργανισμοί να είναι ζωντανοί, η μέθοδος είναι πιο ευαίσθητη και τα αποτελέσματα μπορούν να είναι διαθέσιμα σε μία μόνο ημέρα.

Β. Διπλή PCR (nested PCR)

Η ιδιαίτερα υψηλή ευαισθησία αποτελεί σπουδαίο πλεονέκτημα της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης. Η ευαισθησία είναι δυνατόν, μάλιστα, να αυξηθεί χρησιμοποιώντας την διπλή PCR (nested PCR). Το Πρωτόκολλο της μεθόδου περιλαμβάνει δύο ζεύγη εκκινητών. Με το πρώτο ζεύγος των εκκινητών (amplified primers) ενισχύεται η αλληλουχία-στόχος, ενώ το δεύτερο ζεύγος των εκκινητών (sequencing primers), στοχεύει σε μία εσωτερική αλληλουχία του στόχου και λειτουργεί μόνο στα ενισχυμένα τμήματα, όπου η αλληλουχία είναι απολύτως ακριβής. Έτσι αυξάνεται η ακρίβεια της αρχικής PCR. Το τελικό αποτέλεσμα διακρίνεται για την υψηλού βαθμού ακρίβεια, ειδικότητα και ευαισθησία. Ίσως το μόνο μειονέκτημα της διπλής PCR αποτελεί η πιθανή επιμόλυνση από τους πρόσθετους χειρισμούς των δειγμάτων.



Εικόνα 8.: Διπλή PCR-nested PCR

Γ. PCR Πραγματικού Χρόνου (Real –Time PCR)

Η Real-Time PCR ορίζεται ως μία ποσοτική Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης, η οποία καθιστά δυνατή τη μέτρηση του αριθμού των αντιγράφων (PCR προϊόντα) που παράγονται κατά την αντίδραση της PCR.

Η αρχή λειτουργίας της βασίζεται στην ανίχνευση και ποσοτικοποίηση του φθορισμού που εκπέμπεται από ειδικά φθοριοχρώματα. Η Real-Time PCR εκτός από το ζεύγος των εκκινητών, απαιτεί και έναν φθορίζων δείκτη, ο οποίος είναι μία ολιγονουκλεοτιδική αλληλουχία, η οποία συνδράμει στην οπτικοποίηση του αριθμού των προϊόντων της PCR, το να γίνουν δηλαδή τα προϊόντα ορατά.

Στην Real-Time PCR διακρίνονται τέσσερις χαρακτηριστικές φάσεις:

- ✓ Πρώτη φάση: είναι κρυμμένη κάτω από το «θόρυβο» του φθορισμού,
- ✓ Δεύτερη φάση: περιλαμβάνει την εκθετική ενίσχυση,
- ✓ Τρίτη φάση: γραμμική ενίσχυση και απότομη αύξηση του φθορισμού
- ✓ Τέταρτη φάση: χαρακτηρίζεται από την εξασθένηση του ρυθμού της εκθετικής συσσώρευσης προϊόντος [87].

Η ποσότητα του παραγόμενου προϊόντος είναι ευθέως ανάλογη με την αρχική ποσότητα του στόχου στην αντίδραση μόνο κατά τη διάρκεια της εκθετικής φάσης ενίσχυσης [88].

Ποιά είναι όμως τα πλεονεκτήματα της μεθόδου αυτής, σε σχέση με την απλή PCR αλλά και άλλες μοριακές μεθόδους; η ιδιαίτερα υψηλή ευαισθησία της έρχεται να απαντήσει το ερώτημα τούτο, στην οποία μάλιστα αποδίδεται και η ανίχνευση αντιγράφων νουκλεϊνικών αλληλουχιών λιγότερων από πέντε.

Άλλα πολλαπλά πλεονεκτήματα είναι ο μικρότερος χρόνος που απαιτείται για την αντίδραση με την παράλληλη ανάλυση του αποτελέσματος, η υψηλή ακρίβεια της μεθόδου, η δυνατότητα επαναληψιμότητας εξαιτίας του αυτοματισμού της αντίδρασης και της ανάλυσης, η αποφυγή επιμολύνσεων, λόγω της εκτέλεσης της αντίδρασης σε ένα υψηλής τεχνολογίας «κλειστό» σύστημα, ώστε να μην απαιτούνται χειρισμοί μετά την PCR για την ανάλυση του προϊόντος και να ελαχιστοποιούνται έτσι οι επιμολύνσεις στο εργαστήριο και τέλος η δυνατότητα ποσοτικοποίησης. Λόγω αυτών των πλεονεκτημάτων χρησιμοποιείται στην ανίχνευση και τυποποίηση πλήθους παθογόνων μικροοργανισμών [89].

1.3 ΣΚΟΠΟΣ

Οι μικροοργανισμοί *Mycoplasma spp.* και *Ureaplasma spp.* την τελευταία δεκαετία έχουν συγκεντρώσει το ενδιαφέρον τόσο της επιστημονικής κοινότητας, όσο και της διεθνούς βιβλιογραφίας, εφόσον εμπλέκονται σε ποικίλα σεξουαλικά μεταδιδόμενα νοσήματα και λοιμώξεις που εντοπίζονται στο ουρογεννητικό σύστημα ανδρών και γυναικών.

Η εισαγωγή των μοριακών μεθόδων στην εργαστηριακή διάγνωση των παθογόνων αυτών υπήρξε επαναστατική, παρέχοντας διευκόλυνση στην ανίχνευσή τους, καθώς και στην συγκέντρωση πολύτιμων επιδημιολογικών στοιχείων, σχετικών με τον επιπολασμό των ουρογεννητικών λοιμώξεων από αυτούς τους μικροοργανισμούς.

Η ανίχνευση των μικροοργανισμών δύναται να πραγματοποιηθεί γενικά με τρεις διαφορετικές μεθόδους: με την εμπορική δοκιμασία Mycoplasma IES (Autobio Diagnostics) και δύο μοριακές μεθόδους, την PCR και την Real-Time PCR. Με το kit Mycoplasma IES γίνεται η ποσοτικοποίηση του *U.urealyticum* και του *M.hominis* στα κλινικά δείγματα. Με την PCR πραγματοποιείται ανίχνευση και διαχωρισμός του μικροοργανισμού σε *Mycoplasma spp* και *Ureaplasma spp.* Τέλος, με την Real-Time PCR πραγματοποιείται ανίχνευση και ταυτοποίηση του μικροοργανισμού σε επίπεδο είδους.

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η ανίχνευση της επίπτωσης των *Mycoplasma spp.* και *Ureaplasma spp.* σε κλινικά δείγματα τραχηλικών επιχρισμάτων σε γυναίκες κυρίως αναπαραγωγικής ηλικίας στην Θεσσαλία, δεδομένου ότι δεν υπάρχουν επιδημιολογικά δεδομένα. Όλες οι γυναίκες που συμμετείχαν στη μελέτη (N=94) είχαν αρνητικό κυτταρολογικό έλεγχο κατά Παπανικολάου (αρνητικές για τραχηλικές ενδοεπιθηλιακές αλλοιώσεις) με βάση τον τακτικό έλεγχο και το ιστορικό τους. Έγινε καταγραφή δημογραφικών στοιχείων, καθώς και στοιχείων από το ιστορικό τους, υπό τη μορφή Ερωτηματολογίου, όπου και συλλέχθηκαν πληροφορίες σχετικές με το μαιευτικό και γυναικολογικό ιστορικό, σεξουαλική ζωή, όπως ηλικία έναρξης σεξουαλικών επαφών και αριθμό σεξουαλικών συντρόφων.

Τα δείγματα ελήφθησαν από γυναίκες αναπαραγωγικής στην πλειοψηφία τους ηλικίας, σεξουαλικά ενεργές, χωρίς κλινικά εμφανή συμπτωματολογία. Οι γυναίκες αυτές, 94 συνολικά (n=94) εξετάστηκαν στα εξωτερικά ιατρεία της γυναικολογικής κλινικής του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας κατά το χρονικό διάστημα: Ιούνιος 2015 - Φεβρουάριος 2016.

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε η Real-Time PCR, η οποία όπως ήδη έχει αναφερθεί, εμφανίζει τα περισσότερα πλεονεκτήματα και την υψηλότερη ευαισθησία σε σύγκριση με τις άλλες μεθόδους.

2. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ - ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Συλλογή και προέλευση των δειγμάτων

Το υλικό της μελέτης αποτέλεσαν 94 κλινικά δείγματα που προήλθαν από γυναίκες ασθενείς, οι οποίες προσήλθαν στα εξωτερικά ιατρεία της Γυναικολογικής κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας, χωρίς συμπτωματολογία από το ουρογεννητικό σύστημα. Οι γυναίκες αυτές ήταν σεξουαλικά ενεργές, στην πλειοψηφία τους αναπαραγωγικής ηλικίας (19-59 ετών) και δεν ήταν εμβολιασμένες έναντι του ιού HPV. Επίσης, το τεστ ΠΑΠ ήταν αρνητικό, δεν εμφάνιζαν δηλαδή ενδοεπιθηλιακές κυτταρολογικές αλλοιώσεις ή φλεγμονή στον τράχηλό τους, με βάση το ιστορικό τους. Οι ασθενείς προσήλθαν στα εξωτερικά ιατρεία της γυναικολογικής κλινικής κατά το χρονικό διάστημα Ιούνιος 2015 - Φεβρουάριος 2016, δηλαδή περίοδο 8 μηνών.

Ο αποκλεισμός γυναικών με εικόνα φλεγμονής στο ΠΑΠ έγινε στα πλαίσια ότι κύριος σκοπός της μελέτης ήταν ο προσδιορισμός του αποικισμού από τους συγκεκριμένους μικροοργανισμούς, γιατί είναι γνωστό ότι τόσο το μυκόπλασμα όσο και το ουρεάπλάσμα συμμετέχουν και συνεπικουρούν σε λοίμωξη από άλλους παθογόνους μικροοργανισμούς (γονόκοκκος, χλαμμύδια κλπ).

Αρχικά ελήφθη το ιστορικό των γυναικών της μελέτης βάσει ερωτηματολογίου που περιελάμβανε τα ακόλουθα στοιχεία: αιτία προσέλευσης στα εξωτερικά ιατρεία, δημογραφικά στοιχεία, ηλικία, ηλικία έναρξης σεξουαλικών επαφών, συνολικός αριθμός σεξουαλικών συντρόφων, ιστορικό γνωστού σεξουαλικά μεταδιδόμενου νοσήματος στο παρελθόν, φαρμακευτική αγωγή (αντιβιοτική αγωγή). Ελήφθη ΠΑΠ, ακολούθησε επιβεβαίωση του αρνητικού κυτταρολογικού ελέγχου κατά Παπανικολάου και εν συνεχεία έγινε η λήψη των τραχηλικών επιχρισμάτων για ανίχνευση των εν λόγω μικροοργανισμών.

Τα δείγματα ελήφθησαν διακολπικά, υπό άμεση όραση, με τη βοήθεια κολποδιαστολέα και αφορούσαν σε λήψη ενδοτραχηλικού εκκρίματος με χρήση στυλεών (endocervical brush), με σκοπό την μοριακή ανίχνευση των: *U. urealyticum*, *U. parvum*, *M. hominis*, *M. genitalium*.

2.2 Εξαγωγή DNA από δείγματα (DNA-Extraction)

Η εξαγωγή του DNA από τα δείγματα πραγματοποιήθηκε με το εμπορικό kit Quick gDNA MiniPrep (ZYMO Research). Η εκχύλιση διενεργήθηκε, σύμφωνα με το πρωτόκολλο του παρασκευαστή το οποίο παρατίθεται παρακάτω:

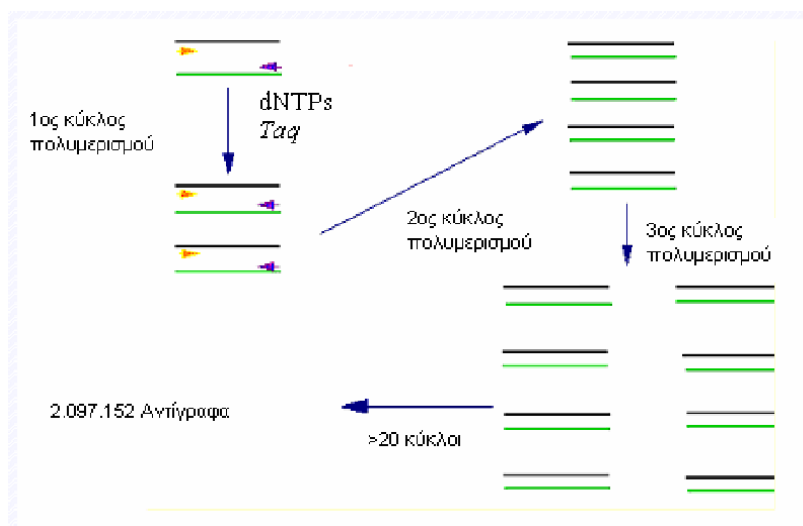
1. Ανάμιξη 200 µl ζωμού με 800 µl Lysis Buffer (αναλογία 4:1), ανάμιξη σε vortex και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min
2. Μεταφορά του δείγματος σε μία στήλη Zymo – Spin μέσα σε φιαλίδιο που παρέχονται από το kit (800+200 µl) και φυγοκέντρωση στις 11.400 rpm για 1 min
3. Μεταφορά της στήλης Zymo - Spin σε καθαρό φιαλίδιο, προσθήκη 200 µl Pre-Wash Buffer και φυγοκέντρωση στις 11400 rpm για 1 min
4. Μεταφορά της στήλης Zymo – Spin σε καθαρό φιαλίδιο και προσθήκη 500 µl Wash Buffer και φυγοκέντρωση στις 11.400 rpm για 1 min
5. Προσθήκη 50 µl DNA Elution Buffer, επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min και φυγοκέντρωση στις 14.680 rpm για 30 sec

Το διάλυμα που έχει διέλθει από την μεμβράνη είναι το DNA και αποθηκεύεται στους -20°C.

2.3 Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR)

Η πιο ευρέως γνωστή τεχνική από τις NAATs (μέθοδοι ενίσχυσης νουκλεϊκών οξέων) είναι η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) [86]. Η τεχνική της PCR χρησιμοποιεί δύο σχεδιασμένες ολιγονουκλεοτιδικές αλληλουχίες οι οποίες ονομάζονται εκκινητές και είναι συμπληρωματικές σε συγκεκριμένες περιοχές DNA που βρίσκονται στον οργανισμό-στόχο. Οι περιοχές αυτές πρέπει να είναι εύκολα προσβάσιμες για τους εκκινητές και αυτό επιτυγχάνεται με πολύ υψηλές θερμοκρασίες, οι οποίες αποδιατάσσουν τη διπλή έλικα του DNA σε εκείνη την περιοχή. Οι εκκινητές προσδένονται στα άκρα της αλληλουχίας-στόχου και οριοθετούν το τμήμα του DNA που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί. Στο τελευταίο στάδιο της αντίδρασης, το οποίο συνήθως πραγματοποιείται στους 72°C, η Taq πολυμεράση, μια θερμοσταθερή DNA πολυμεράση, αντιγράφει τους δύο κλώνους ξεκινώντας από τους εκκινητές. Αυτά τα τρία βήματα αποτελούν έναν κύκλο της PCR, στο τέλος του οποίου ο αριθμός των μορίων DNA που φέρουν την αλληλουχία-στόχο έχει διπλασιαστεί. Κατόπιν, η διαδικασία επαναλαμβάνεται, με

αποτέλεσμα ο αριθμός των μορίων DNA που φέρουν την αλληλουχία-στόχο να τετραπλασιάζεται, στη συνέχεια να οκταπλασιάζεται και ούτω καθεξής. Συνήθως η διαδικασία πραγματοποιείται για 25-40 κύκλους, οπότε δημιουργούνται εκατομμύρια αντίγραφα της αλληλουχίας-στόχου (Εικόνα 2.2) [86].



Εικόνα 9. Κύκλος της αντίδρασης PCR

Η αντίδραση της PCR ολοκληρώνεται στο ίδιο μείγμα αντιδραστηρίων, για το οποίο απαιτούνται:

- ✓ DNA στόχος
- ✓ Εκκινητικά μόρια (primers)
- ✓ Τριφωσφορικά δεοξυροβονουκλεοτίδια
- ✓ Ένζυμο DNA πολυμεράση
- ✓ Ιόντα Mg^{2+} απαραίτητα για την ενζυμική δράση
- ✓ Κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα pH~8,2 για την δράση του ενζύμου.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

ΥΛΙΚΑ

- 10x Taq Buffer with KCl (thermo scientific)
- 10x Taq Buffer with $(NH_4)_2SO_4$ (thermo scientific)
- $MgCl_2$ (25mM)
- Νουκλεοτίδια (dNTPs)

- Taq DNA πολυμεράση (thermo scientific)
- H₂O αποστειρωμένο
- Εκκινητές (primers) (πίνακας 1)

Παραδείγματα εκκινητών που χρησιμοποιούνται παρουσιάζονται στον πίνακα 2.1.

Εκκινητής	Αλληλουχία	Γονίδιο-στόχος
My-ins	5'-GTAATACATAGGTCGCAAGCGTTATC-3'	16S rRNA
Mycoplasma		
Ureaplasma		
MGSO-2-Bi	5'-CACCATCTGTCACTCTGTTAACCTC-3	16S rRNA
Mycoplasma		
UGSO-Bi	5'-CACCACCTGTCATATTGTTAACCTC-3	16S rRNA
Ureaplasma		

Πίνακας 2.1. Παραδείγματα εκκινητών που χρησιμοποιούνται.

Οι εκκινητές ενισχύουν το τμήμα 520 bp του γονιδίου 16S rRNA για *Mycoplasma* και *Ureaplasma*. Η μέθοδος της PCR με τα δύο ζεύγη εκκινητών ανιχνεύει *Mycoplasma* και *Ureaplasma* χωρίς να μπορεί να διαχωρίσει τα είδη. Στους πίνακες 2.2 και 2.3 παρουσιάζονται τα υλικά που χρησιμοποιούνται, καθώς και οι θερμοκυκλοποιητικές συνθήκες PCR.

<i>Αντιδραστήρια</i>	<i>Όγκος</i>	<i>Τελική συγκέντρωση</i>
Buffer με KCl (10x optimized)	3.5 μ l	1x
Buffer με (NH₄)₂SO₄ (10x optimized)	1.5 μ l	1x
dNTPs (10mM)	3 μ l	0,2 mM
MgCl₂ (25mM)	4 μ l	2mM
Forward primer (100μmol/μl)	0.5 μ l	0.5 μ M
Reverse primer (100μmol/μl)	0.5 μ l	0,25 μ M
Πολυμεράση Taq (1U/μl)	0.2 μ l	5 U/ μ l
DNA	10 μ l	10-50 ng
ddH₂O	26.8 μ l	
Συνολικός όγκος	50 μ l	

Πίνακας 2.2. Αντίδραση PCR

Αρχική αποδιάταξη	95 °C για 10 min	
Αποδιάταξη	94 °C για 30 sec	50 κύκλους
Υβριδοποίηση	55°C για 30 sec	
Επιμήκυνση	72 °C για 1 min	
Τελική επιμήκυνση	72 °C για 7 min	

Πίνακας 2.3. Συνθήκες πραγματοποίησης της PCR

2.4 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης

Η μέθοδος που χρησιμοποιείται για την αναγνώριση και τον διαχωρισμό των θραυσμάτων DNA είναι η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Η τεχνική αυτή είναι απλή, γρήγορη και ικανή να διαχωρίζει μίγματα θραυσμάτων DNA, τα οποία δεν μπορούν να διαχωριστούν με άλλες τεχνικές.

Σύμφωνα με αυτήν την τεχνική, τα θραύσματα DNA αναγκάζονται να κινηθούν μέσω των πόρων που σχηματίζονται σε πήκτωμα αγαρόζης, υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Η ηλεκτροφορητική ικανότητα του DNA στο πήκτωμα αγαρόζης εξαρτάται κυρίως από τέσσερις παραμέτρους: το μέγεθος του DNA, τη συγκέντρωση της αγαρόζης, τα στερεοδιάταξη του DNA και την ένταση του ηλεκτρικού ρεύματος. Η θέση του DNA στο πήκτωμα προσδιορίζεται με υπεριώδες φως και τη χρήση μικρής ποσότητας βρωμιούχου αιθιδίου, μιας φθορίζουσας χρωστικής που παρεμβάλλεται μεταξύ των αζωτούχων βάσεων του DNA. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε πήκτωμα αγαρόζης 2%. Πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση στα δείγματα DNA που εκχυλίστηκαν από τα κλινικά δείγματα που απομονώθηκαν και στα προϊόντα των PCR για τον έλεγχο της παρουσίας του επιθυμητού σε μέγεθος προϊόντος. Χαρακτηριστικές εικόνες ηλεκτροφόρησης παρατίθενται στο παράρτημα της παρούσας εργασίας.

Η μεθοδολογία παρατίθεται αναλυτικά παρακάτω:

ΥΛΙΚΑ

- ✓ WFI (Water For Injection – στείρο απυρετογόνο H₂O για τις αραιώσεις)
- ✓ TBE Buffer (Tris – Boric Acid – EDTA), 10x (Lonza)
- ✓ Agarose SeaKem LE (Lonza)
- ✓ Ethidium bromide Soln, (EtBr₂) 10mg/ml (Research Organics)
- ✓ 6x DNA Loading Dye Solution – κυανό της βρωμοφαινόλης (Fermentas)
- ✓ Gene Ruler 100bp DNA Ladder (Invitrogen)
- ✓ Λάμπα UV (MiniBisPro, Bio – Imaging Systems)
- ✓ Συσκευή ηλεκτροφόρησης (Classic CSSU78, Thermo ElectronCo)
- ✓ Τροφοδοτικό Τάσης (EC105 – LVD, Thermo ElectronCo)
- ✓ Φούρνος μικροκυμάτων
- ✓ Κωνική φιάλη 250ml
- ✓ Εκμαγείο και «χτενάκια» στερεοποίησης πηκτώματος
- ✓ Αυτόματα σιφώνια (πιπέτες), αποστειρωμένα ρύγχη και parafilm

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

- Αραίωση του TBE Buffer 10x σε συγκέντρωση 1x, με ανάμιξη 10ml TBE 10x και 90ml νερό (WFI).
- Σε κωνική φιάλη των 250 ml αναμιγνύονται 50 ml TBE Buffer 1x και 1g αγαρόζης έτσι ώστε να προκύψει διάλυμα αγαρόζης 2%w/v. Το διάλυμα αναμιγνύεται ζωηρά με κυκλική ανακίνηση της κωνικής φιάλης.
- Το διάλυμα θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων έως ότου διαλυθεί η αγαρόζη και με βρασμό να διαυγάσει το διάλυμα. Στη συνέχεια αφήνεται να κατέβει η θερμοκρασία περίπου στους 55⁰C (κωνική ανεκτή στην παρειά) ώστε το διάλυμα να μην επηρεάσει το πλαστικό εκμαγείο.
- Προστίθεται 6 μl βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr₂). Το βρωμιούχο αιθίδιο παρεμβάλλεται μεταξύ των ζευγών βάσεων του δίκλωνου DNA, φθορίζοντας σε μήκος κύματος 290nm.
- Τοποθετούνται τα «χτενάκια» στο εκμαγείο, για την δημιουργία βυθισμάτων υποδοχής του DNA, και αποχύνεται προσεκτικά το διάλυμα της αγαρόζης.
- Αφού στερεοποιηθεί εντελώς η αγαρόζη, αφαιρούνται προσεκτικά τα «χτενάκια» και το πήκτωμα είναι πλέον έτοιμο για ηλεκτροφόρηση του DNA, με εμβάπτιση του σε διάλυμα TBE Buffer 1x της συσκευής ηλεκτροφόρησης.
- Αναμιγνύονται 5 μl από έναστο δείγμα DNA με 2 μl χρωστικής (κυανό της βρωμοφαινόλης) Loading Dye Soln και ακολουθεί η προσθήκη των δειγμάτων DNA στα βυθίσματα του πηκτώματος. Για τον προσδιορισμό του μήκους των προϊόντων της PCR είναι απαραίτητη η προσθήκη στο πήκτωμα ενός μάρτυρα μοριακού βάρους. Χρησιμοποιήθηκε ο 100 bp DNA Ladder (Invitrogen).
- Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε σταθερή τάση 160 Volts και ένταση 50 mA για 20 λεπτά. Το ηλεκτροφορηθέν πήκτωμα αγαρόζης τοποθετήθηκε σε συσκευή υπεριώδους φωτός, UV Photo MiniBisPro, Bio – Imaging Systems και φωτογραφήθηκε με Olympus Digital Camera που είναι ενσωματωμένη στη συσκευή.

2.5 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real – Time PCR)

Η Real – Time PCR έχει αποτελέσει επαναστατική μέθοδο στην έρευνα σήμερα, καθώς συνδυάζει τον πολλαπλασιασμό τμημάτων νουκλεϊνικών οξέων, με τη σύγχρονη παρακολούθηση της αντίδρασης σε πραγματικό χρόνο, την ανίχνευση των παραγόμενων προϊόντων και την ποσοτικοποίηση τους κατά απόλυτες και σχετικές τιμές. Πρόκειται για μέθοδο με υψηλή ευαισθησία, επαναληψιμότητα και ευρεία κλίμακα ποσοτικοποίησης. Μεγάλο πλεονέκτημα της μεθόδου είναι η ταχύτητα με την οποία αποδίδει αποτελέσματα, γεγονός που οφείλεται στην αποφυγή των τεχνικών εκείνων που απαιτούνται για την ανίχνευσή των προϊόντων, όπως είναι η ανάλυση με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης, η υβριδοποίηση, οι αντιδράσεις ανοσοεντοπισμού, αλλά και η μείωση του κινδύνου επιμολύνσεων και ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων από τους χειρισμούς των ανωτέρω τεχνικών [90].

Στη Real-Time PCR η ανίχνευση και η παρακολούθηση των προϊόντων εν τη γενέσει τους επιτυγχάνεται με τη χρήση σημασμένων μορίων εκκινητών (ειδική σήμανση) ή φθορίζόντων μορίων που δεσμεύονται στην επιθυμητή αλληλουχία (μη ειδική σήμανση). Τα μόρια-σημαντές παράγουν φθορίζον σήμα, η ποσότητα του οποίου είναι ανάλογη με την ποσότητα του προϊόντος που ενισχύεται με την αντίδραση. Υπάρχουν αρκετές μέθοδοι για τη σήμανση και την ανίχνευση των προϊόντων της Real -Time PCR, οι σημαντικότερες από τις οποίες είναι οι ειδικοί σημασμένοι ανιχνευτές (TaqMan), τα ειδικά δίκλωνα μόρια DNA που βασίζονται στη μεταφορά ενέργειας με απορρόφηση ενέργειας (Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET) και οι μη ειδικές παρεμβαλλόμενες φθορίζουσες χρωστικές (SYBR Green I) [88].

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Στην παρούσα εργασία η Real-Time PCR πραγματοποιήθηκε στη συσκευή RotorGene 6000 (Corbett Research). Η συσκευή διαθέτει κεφαλή 72 θέσεων για σωληνάκια PCR προπυλενίου των 0.1 ml και περιστρέφεται με ταχύτητα 500rpm. Σύμφωνα με τον κατασκευαστή, η συγκεκριμένη ταχύτητα περιστροφής εξασφαλίζει διαφορές θερμοκρασίας μεταξύ των δειγμάτων, μικρότερες του 0.01 K [91].



Εικόνα 10. Κυκλοποιητής Corbett Research

Τα πρωτόκολλα που εφαρμόστηκαν και στα 94 δείγματα και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και οι συνθήκες του θερμοκυκλοποιητή παρουσιάζονται στους παρακάτω πίνακες για κάθε ένα μικροοργανισμό και είναι σύμφωνοι με τις οδηγίες του παρασκευαστή.

1. *Mycoplasma hominis*

<i>Αντιδραστήρια</i>	<i>Όγκος</i>
PCR-mix-1-FRT	(N x)10 μl
PCR-Buffer-FRT	(N x)5 μl
TaqF DNA polymerase	(N x)0.5 μl
Συνολικός όγκος Reaction Mix	(N x) 15μl

Πίνακας 2.4. Αντιδράσεις της Real – Time PCR (όπου N ο συνολικός αριθμός των δειγμάτων)

Σε κάθε σωληνάκι προπυλενίου προστέθηκαν 15μl Reaction Mix και 10 μl DNA. Το kit παρέχει θετικό μάρτυρα (Positive Control C+).

Hold	95 °Cγια 15min	
Cycling	95°C για 20 sec	10 κύκλοι
	65°C για 20 sec	
	72 °C για 20 sec	
Cycling 2	92 °C για 20 sec	35 κύκλοι
	60°C για 30 sec	
	72 °C για 15 sec	

Πίνακας 2.5. Συνθήκες πραγματοποίησης της Real – Time PCR

2. *Mycoplasma genitalium*

<i>Αντιδραστήρια</i>	<i>Όγκος</i>
PCR-mix-1-FRT	(N x) 10 µl
PCR-Buffer-FRT	(N x) 5 µl
TaqF DNA polymerase	(N x) 0.5 µl
Συνολικός όγκος Reaction Mix	(N x) 15µl

Πίνακας 2.6. Αντίδρασης της Real – Time PCR (όπου N ο συνολικός αριθμός των δειγμάτων)

Σε κάθε σωληνάκι προπυλενίου προστέθηκαν 15µl Reaction Mix και 10 µl DNA. Το kit παρέχει θετικό μάρτυρα (Positive Control C+).

Hold	95 °Cγια 15min	
Cycling	95°C για 20 sec	10 κύκλοι
	65°C για 20 sec	
	72 °C για 20 sec	

Cycling 2	92 °C για 20 sec	35 κύκλοι
	60°C για 30 sec	
	72 °C για 15 sec	

Πίνακας 2.7. Συνθήκες πραγματοποίησης της Real – Time PCR

3. *Ureaplasma parvum* και *Ureaplasma Urealyticum*

Αντιδραστήρια	Όγκος
PCR–mix-1-FRT	(N x) 10 µl
PCR-Buffer-FRT	(N x) 5 µl
TaqF DNA polymerase	(N x) 0.5 µl
Συνολικός όγκος Reaction Mix	(N x) 15µl

Πίνακας 2.8. Αντίδρασης της Real – Time PCR (όπου N ο συνολικός αριθμός των δειγμάτων)

Σε κάθε σωληνάκι προπυλενίου προστέθηκαν 15 µl Reaction Mix και 10 µl DNA. Το kit παρέχει θετικό μάρτυρα (Positive Control C+).

Hold	95 °C για 15min	
Cycling	95°C για 20 sec	10 κύκλοι
	65°C για 20 sec	
	72 °C για 20 sec	
Cycling 2	95°C για 20 sec	35 κύκλοι
	60°C για 30 sec	
	72 °C για 15 sec	

Πίνακας 2.9. Συνθήκες πραγματοποίησης της Real – Time PCR

Στατιστική ανάλυση

Εκτιμήθηκε η επίπτωση των παθογόνων μικροοργανισμών που μελετήσαμε. Πιθανές συσχετίσεις ταυτόχρονης συνύπαρξης των παθογόνων στα κλινικά δείγματα, καθώς και πιθανή συσχέτιση της παρουσίας τους με τον αριθμό των σεξουαλικών συντρόφων εκτιμήθηκαν με χρήση Spearman's correlation coefficient. Επιπλέον, το δείγμα των ασυμπτωματικών γυναικών που μελετήθηκαν διαχωρίστηκε σε τέσσερις επιμέρους ηλικιακές ομάδες (19-29, 30-39, 40-49 και 50-59 ετών). Η επίπτωση των παθογόνων μεταξύ των ηλικιακών αυτών ομάδων, διερευνήθηκε με τη χρήση Anova .

Το στατιστικό πακέτο που χρησιμοποιήθηκε για την στατιστική ανάλυση ήταν το SPSS 20 statistical package (IBM, Chicago, IL, USA). Τιμές (P values) μικρότερες από 0.05 θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές ($P < 0.05$).

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Αποτελέσματα της ανίχνευσης και ταυτοποίησης των μικροοργανισμών

Ο Πίνακας 1 περιλαμβάνει διάφορες πληροφορίες σχετικά με την αιτία προσέλευσης στα εξωτερικά ιατρεία, διάφορα δημογραφικά στοιχεία, ηλικία, ηλικία έναρξης σεξουαλικών επαφών, συνολικός αριθμός σεξουαλικών συντρόφων, ιστορικό γνωστού σεξουαλικά μεταδιδόμενου νοσήματος στο παρελθόν, φαρμακευτική αγωγή (αντιβιοτική αγωγή) που αφορούσε τις 94 γυναίκες που περιελήφθησαν στην μελέτη. Όλες οι γυναίκες ήταν Ελληνικής καταγωγής.

Πίνακας 1. Στοιχεία ερωτηματολογίου στις γυναίκες που εξετάστηκαν

Ηλικία (σε έτη)	Μέσος όρος: 34 ετών (19-59)
Μορφωτικό επίπεδο	n% - n (total)=94
Δημοτικό-Γυμνάσιο	7 (7,4%)
Λύκειο	58 (61,7%)
Πανεπιστήμιο	29 (30,8%)
Ηλικία έναρξης σεξουαλικών επαφών	Μέσος όρος: 22 ετών (16-32)
Αριθμός σεξουαλικών συντρόφων	n%
<3	46 (49%)
>=3	48 (51%)
	Μέσος όρος: 3 (0-6)
Κυήσεις	n%
Ναι	49 (52%)
Όχι	45 (48%)

Ελήφθησαν 94 δείγματα (τραχηλικά επιχρίσματα) από γυναίκες-ασθενείς που προσήλθαν στα εξωτερικά ιατρεία της Γυναικολογικής κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας, χωρίς κλινική υποψία λοίμωξης από *Mycoplasma* ή *Ureaplasma*. Τα δείγματα αναλύθηκαν με την μέθοδο Real-Time PCR, ως η πλέον ευαίσθητη και ειδική μέθοδος.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, τα οποία παρατίθενται στον **Πίνακα 2**, σε 34 από τα 94 δείγματα τραχηλικού επιχρίσματος (36,2%) απομονώθηκαν τα ακόλουθα σεξουαλικά μεταδιδόμενα παθογόνα: *U.parvum* και *M.hominis*, με το πρώτο παθογόνο να συγκεντρώνει το μεγαλύτερο ποσοστό αποικισμού στις γυναίκες (34%). Τόσο για το *U.parvum* όσο και για το *M.hominis*, η ηλικία των γυναικών με τη μεγαλύτερη επίπτωση, φάνηκε να είναι αυτή των 19-29 ετών. Ωστόσο, η χρήση Ανονα δεν ανέδειξε στατιστικές σημαντικές συσχετίσεις ως προς την επίπτωση των παθογόνων σε σχέση με τις επιμέρους ηλικιακές ομάδες γυναικών.

Πίνακας 2. Επίπτωση του *U.parvum* και *M.hominis* στο συνολικό δείγμα γυναικών, καθώς και στις τέσσερις επιμέρους, ηλικιακές ομάδες

	Total positivity	19 -29 ετών	30 – 39 ετών	40 - 49 ετών	50-59 ετών
	n = 94	n = 41	n = 23	n = 18	n = 12
<i>U.parvum</i>	32 (34%)	19 (46.3%)	7 (30.4%)	4 (22.2%)	2 (16.7%)
<i>M.hominis</i> *	2 (2.1%)	1 (2.4%)	0 (0%)	1 (5.6%)	0 (0%)

Αξιίζει να σημειωθεί ότι οι δύο γυναίκες που βρέθηκαν θετικές στο *M. hominis** ήταν ταυτόχρονα θετικές και στο *U. parvum*. Έτσι η παρουσία του *U. parvum* εμφάνισε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την συνύπαρξη του *M. hominis* (Spearman's r : 0.205/ p : 0.047)

Πίνακας 3.

Πίνακας 3. Spearman's rho και p values για την συσχέτιση μεταξύ *U. parvum* και *M. hominis*

	<i>Ureaplasma</i>
<i>Mycoplasma</i>	0.205* ($p=0.047$)

Ως επίπεδο στατιστικώς σημαντικής συσχέτισης ορίζεται η τιμή 0.05

Επιπρόσθετα, η παρουσία των προαναφερθέντων παθογόνων δεν εμφάνισε στατιστικώς σημαντική συσχέτιση με τον αριθμό των σεξουαλικών συντρόφων, όπως αυτός είχε αναφερθεί από τις γυναίκες κατά τη λήψη του ιστορικού τους και την συμπλήρωση των ερωτηματολογίων,

Πίνακας 4.

Πίνακας 4. Συσχετίσεις Spearman's του αριθμού των σεξουαλικών συντρόφων με την επίπτωση των *U. parvum* και *M. hominis*

	Spearman's rho	P
<i>Ureaplasma</i>	0.136	0.207
<i>Mycoplasma</i>	0.020	0.852

Ως επίπεδο στατιστικώς σημαντικής συσχέτισης ορίζεται η τιμή 0.05

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Αρκετές μελέτες στη διεθνή βιβλιογραφία έχουν δείξει κατά καιρούς ότι η επικράτηση ποικίλων σεξουαλικά μεταδιδόμενων παθογόνων μεταξύ ασυμπτωματικών πληθυσμών, ποικίλει παγκοσμίως. Παράγοντες όπως: η γεωγραφική περιοχή, η ηλικία, η σεξουαλική συμπεριφορά (συχνή εναλλαγή σεξουαλικών συντρόφων), το κοινωνικο-οικονομικό επίπεδο, το μαιευτικό ιστορικό, η χρήση μέτρων αποφυγής μετάδοσης σεξουαλικά μεταδιδόμενων παραγόντων-μέτρων αντισύλληψης κατηγορίας φραγμού (συγκεκριμένα η χρήση προφυλακτικού) και το ιστορικό αποικισμού σεξουαλικά μεταδιδόμενων μικροοργανισμών στους άνδρες-συντρόφους, καθορίζουν είτε ανεξάρτητα, είτε ως συνυπάρχοντες παράγοντες την έκταση επιπολασμού των παθογόνων που έχουν προαναφερθεί, σε υγιείς-ασυμπτωματικούς πληθυσμούς. Μεταξύ υγιών γυναικών σε μελέτη στην Κορέα, το 49,2% ανευρίσκεται αποικισμένο από τουλάχιστον έναν σεξουαλικά μεταδιδόμενο μικροοργανισμό (*HPV*, *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae*, *M. genitalium*, *M. hominis*, *U. urealyticum*, *U. parvum*, *T. vaginalis*), ενώ παράλληλα σε γυναίκες θετικές για αυτά τα παθογόνα, τα ποσοστά μονήρους, διπλής και τριπλής λοίμωξης από κάποιους εκ των προαναφερθέντων μικροοργανισμών βρέθηκαν 76,3%, 20,4% και 3,3% αντίστοιχα [92]. Στη Νότιο Αφρική, ένα 10,8% των γυναικών είναι προσβεβλημένες από το *M. genitalium*, ενώ η επικράτηση της λοίμωξης σε γυναίκες στα νησιά Solomon με *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae* και *T. pallidum* βρέθηκε σε ποσοστά 20%, 5,1% και 4,1% αντίστοιχα [93]. Στο Μεξικό σε γυναίκες που εξετάστηκαν στα πλαίσια του ετήσιου γυναικολογικού ελέγχου ρουτίνας, ο συνολικός επιπολασμός των σεξουαλικά μεταδιδόμενων μικροοργανισμών άγγιζε το ποσοστό του 57,7% και ο περισσότερος συχνά ανιχνευθείς μικροοργανισμός βρέθηκε να είναι το *U. parvum* (39,8%), ακολουθούμενο από την *G. vaginalis* (25,9%), τον ιό HPV (18,4%), το *C. trachomatis* (1,5%) και το *M. genitalium* (0,5%) [94]. Τέλος, άλλη έρευνα από την Ιταλία καταδεικνύει την επικράτηση των παθογόνων *U. urealyticum* και *M. hominis* σε ποσοστό που αγγίζει σχεδόν τον μισό πληθυσμό, ήτοι, 44.5% [95].

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήσαμε τα μυκοπλάσματα και τα ουρεοπλάσματα που αποικίζουν το ουρογεννητικό σύστημα και προσδιορίσαμε την συχνότητα ανίχνευσής τους σε κλινικά δείγματα του ουρογεννητικού συστήματος ασυμπτωματικών γυναικών (απουσία κλινικής συμπτωματολογίας και ΠΑΠ αρνητικές) που προσήλθαν στο Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας κατά τη διάρκεια ενός οκταμήνου περίοδο Ιούνιος 2015 - Φεβρουάριος 2016. Η ανίχνευση και η ταυτοποίηση των μικροοργανισμών πραγματοποιήθηκε με τη μοριακή μέθοδο Real- Time PCR, η οποία χαρακτηρίζεται από τη μεγαλύτερη ευαισθησία και ειδικότητα σε σχέση με τις άλλες μεθόδους.

Συγκεκριμένα, στη μελέτη μας το 34% των κλινικών δειγμάτων ανέδειξε την παρουσία *U.parvum*, ενώ το 2.1% των δειγμάτων ήταν θετικό για *M.hominis*. Σε κανένα κλινικό δείγμα δεν ανιχνεύθηκε ούτε *U.urealyticum*, αλλά ούτε και *M.genitalium*. Στην παρούσα μελέτη ο επιπολασμός του εν λόγω παθογόνου ήταν 34%, διπλάσια δηλαδή συχνότητα ανίχνευσης από αυτήν που πρόσφατα περιγράφηκε στη Βόρειο Ελλάδα (34 έναντι 16,13%). Πώς όμως θα μπορούσε να εξηγηθεί η μεγάλη αυτή διαφορά; την απάντηση στο ερώτημα τούτο, έρχεται να δώσει το γεγονός ότι και τα 94 κλινικά δείγματα της μελέτης μας, αναλύθηκαν με χρήση της Real-Time PCR, η οποία εμφανίζει πολύ μεγαλύτερη ευαισθησία από τις παραδοσιακές τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν στην προαναφερθείσα μελέτη .

Ανάλογα με την περιοχή και τον πληθυσμό της μελέτης τα ποσοστά ανίχνευσης των μικροοργανισμών αυτών ποικίλλουν, ενώ σημαντικό ρόλο παίζει και η διαγνωστική μέθοδος που επιλέγεται. Οι Takahashi et al., 2006, ανίχνευσαν το *M.hominis* σε ποσοστό 4%, το *M.genitalium* σε ποσοστό 1%, το *U.urealyticum* σε ποσοστό 12% και το *U.parvum* σε ποσοστό 23% [99]. Επίσης, στην Τυνησία, το *U.urealyticum* ανιχνεύθηκε στο 15% των κλινικών δειγμάτων, το *U.parvum* στο 4,2%, το *M.hominis* σε ποσοστό 10,8% και το *M.genitalium* σε ποσοστό 5%. Ανάλογη μελέτη των Imudia et al., 2008, στις ΗΠΑ καταδεικνύει την ανίχνευση του *U.urealyticum* σε ποσοστό 20,1% και του *M.hominis* σε ποσοστό 1,3%.

Η διαφοροποίηση των αποτελεσμάτων σχετίζεται επίσης με παράγοντες που εν γένει επηρεάζουν τον αποικισμό των μικροοργανισμών, όπως είναι η ηλικία, το κοινωνικό-οικονομικό επίπεδο, η σεξουαλική δραστηριότητα με πολλαπλούς συντρόφους καθώς επίσης και η εθνικότητα. Φαίνεται πως οι αφρικανοί και οι αμερικάνοι εμφανίζουν μεγαλύτερα ποσοστά ανίχνευσης των μικροοργανισμών.

Στην Ελλάδα οι μελέτες που έχουν γίνει για την συχνότητα ανίχνευσης των μυκόπλασμάτων και των ουρεοπλάσμάτων δεν είναι πολλές και σε αυτές χρησιμοποιήθηκε κυρίως κάποια εμπορική δοκιμασία όπως είναι το Mycoplasma IES ή η καλλιέργεια και όχι η Real-Time PCR. Συνεπώς, τα αποτελέσματά μας με την Real-Time δεν είναι συγκρίσιμα με τις μελέτες της υπόλοιπης Ελλάδας. Οι Kechagia et al, 2008, στην Αθήνα έλεγξαν 369 γυναίκες με κολπίτιδα με την εμπορική δοκιμασία Mycoplasma IST 2 Kit (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France) [23]. Το 37,1% των γυναικών ήταν θετικό είτε στο *M.hominis*, είτε στο *U.urealyticum*, είτε και στα δύο μαζί, πολλές φορές σε συνδυασμό με άλλους μικροοργανισμούς του γεννητικού συστήματος. Από αυτές, το 47,44% ήταν θετικό μόνο για *U.urealyticum*, το 0,72% μόνο για *M.hominis*, το 2,92% είχε και τα δύο ενώ στο 48,90% συνυπήρχαν τα γεννητικά μυκοπλάσματα με άλλους μικροοργανισμούς. Σε παρόμοια μελέτη που έγινε στη χώρα μας και αφορούσε συμπτωματικές

γυναίκες, το 20,8% των γυναικών ήταν θετικές στο *U.urealyticum* ενώ το 1,9% ήταν θετικό στο *M.hominis* πάντα σε συνύπαρξη με το *U.urealyticum* [7]. Επίσης, οι Baka et al., 2009, στην Αθήνα, ανίχνευσαν σε γυναίκες με χρόνια ουρηθρικό σύνδρομο το *U.urealyticum* σε ποσοστό 52,9% και το *M.hominis* σε ποσοστό 3,3% με την μέθοδο της καλλιέργειας [7].

Ο μικροοργανισμός *M.genitalium* δεν ανιχνεύθηκε στα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν στην εργασία. Γενικά ο μικροοργανισμός αν και είναι διαδεδομένος και συσχετίζεται με την μη γονοκοκκική ουρηθρίτιδα, αφού είναι το τρίτο συχνότερο αίτιο στο 15-25% των περιπτώσεων, πάντα έχει τα μικρότερα ποσοστά ανίχνευσης σε σχέση με τους υπολοίπους μικροοργανισμούς. Οι Ito et al., 2013, ανίχνευσαν σε ποσοστό 0,9% *M.genitalium*, 29,6% *M.hominis*, 27,8% *U.urealyticum*, και 20,1% *U.parvum*. Σε μελέτη που έγινε στην Αθήνα ανιχνεύθηκε σε ποσοστό 18% σε 150 δείγματα [98].

Επίσης, παρατηρήσαμε ότι στη μελέτη μας το *U.parvum* επικρατεί έναντι του *U.urealyticum*. Στην Βόρεια Ελλάδα οι Kotrotsiou et al., 2013, ανίχνευσαν το *Ureaplasma spp.* σε ποσοστό 16,1%, από τα οποία το 96,4% ήταν *U.parvum* ενώ το 3,6% ήταν *U.urealyticum* [6]. Οι Jalal et al., 2013, επίσης απομόνωσαν το *U.parvum* σε ποσοστό 37% ενώ το *U.urealyticum* σε ποσοστό 16%.

Σχετικά με τον ρόλο που διαδραματίζει το *U. parvum* στην αιτιοπαθογένεια των λοιμώξεων του γεννητικού συστήματος, προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι τα γεννητικά ουρεοπλάσματα, συμπεριλαμβανομένου του *U. urealyticum biovar 2*, καθώς και του *U. parvum* τείνουν να θεωρούνται μικροοργανισμοί της φυσιολογικής μικροβιακής χλωρίδας του κατώτερου γεννητικού συστήματος στον άνθρωπο, διότι πολύ συχνά απομονώνονται από ασυμπτωματικούς ασθενείς [100]. Παρόλο που η κλινική τους σημασία δεν έχει αποδειχθεί ακόμα, πολλές μελέτες αναδεικνύουν την συμμετοχή των παθογόνων αυτών σε περιπτώσεις επαναλαμβανόμενων αποβολών, υπογονιμότητας, πυελικής φλεγμονώδους νόσου, ορχίτιδος, επιδιδυμίτιδος, προστατίτιδας και μη-γονοκοκκικής ουρηθρήτιδας. Η μέχρι τώρα δημοσιευμένη βιβλιογραφία στερείται ύπαρξης αδιαμφισβήτητων συμπερασμάτων, ενώ αμφιβολίες συνεχίζουν να ανακύπτουν για το εάν τα ουρεοπλάσματα είναι όντως παθογόνα ή περισσότερο συμπαράγοντες που συνεισφέρουν σε γεννητικές λοιμώξεις, αλλά δεν αποτελούν ανεξάρτητο αιτιολογικό παράγοντα των τελευταίων [101].

Στη μελέτη μας προσπαθήσαμε να διερευνήσουμε τη σχέση της ταυτόχρονης παρουσίας μυκοπλάσματος και ουρεαπλάσματος. Βέβαια, η συνύπαρξη του *U. parvum* με το *M. hominis* , όπως περιγράφηκε στην παρούσα μελέτη, επιβεβαιώνει το γεγονός ότι η παρουσία του *U. parvum* είναι καθοριστική για την παρουσία και άλλων σεξουαλικά μεταδιδόμενων

μικροοργανισμών στο γεννητικό σύστημα υγιών γυναικών, προτείνοντας ότι η μεικτή λοίμωξη αποτελεί ουσιώδη παράγοντα στην μικροβιακή παθογένεια του γεννητικού συστήματος [102].

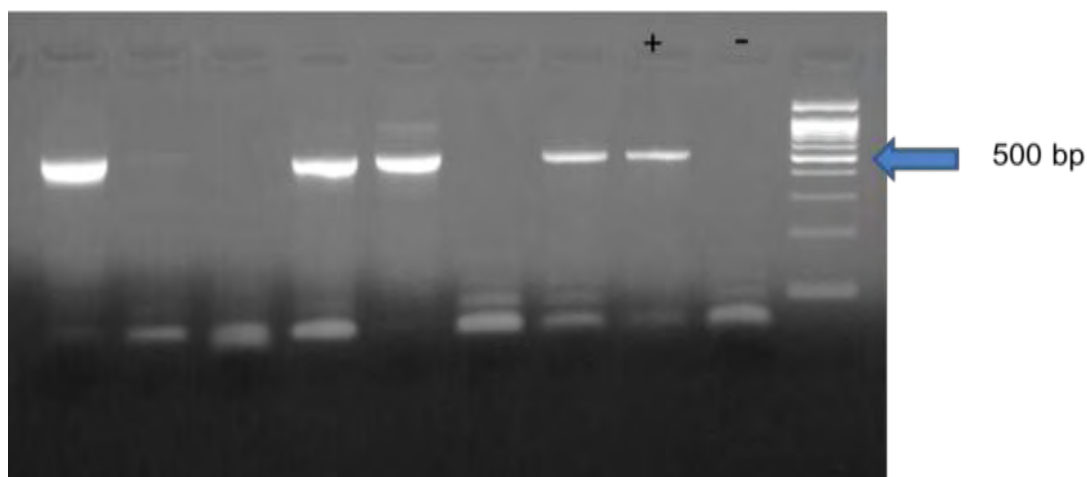
Στα αποτελέσματα της εργασίας μας δεν φάνηκε στατιστικά σημαντική διαφορά της παρουσίας μυκοπλάσματος και ουρεαπλάσματος στις διάφορες ηλικιακές ομάδες. Συνήθως, άτομα 20-40 έχουν έντονη σεξουαλική δραστηριότητα και πιθανό πολλαπλούς συντρόφους γεγονός που αυξάνει την πιθανότητα μετάδοσης των μικροοργανισμών. Στη μελέτη Kotrotsiou *et al.*, 2013, η πλειονότητα των φορέων του *U.urealyticum* ήταν γυναίκες σε αναπαραγωγική ηλικία [6]. Επίσης, οι Iwasaka *et al.*, 1986, είχαν ανιχνεύσει το *U.urealyticum* σε ποσοστό 40% σε σεξουαλικά ανενεργές γυναίκες, 67% σε σεξουαλικά ενεργές γυναίκες σε αναπαραγωγική ηλικία και 25% σε γυναίκες με εμμηνόπαυση [96].

Συνεπώς, η συχνότητα ανίχνευσης του μυκοπλάσματος και του ουρεοπλάσματος είναι αρκετά υψηλή στην περιοχή της Θεσσαλίας στην Ελλάδα αν και είναι διαφορετική σε σύγκριση με άλλες χώρες ως προς το είδος του μικροοργανισμού που ανιχνεύεται. Επίσης, η Real-Time PCR είναι μία μέθοδος με υψηλή ευαισθησία και η εισαγωγή της στο κλινικό διαγνωστικό εργαστήριο είναι απαραίτητη.

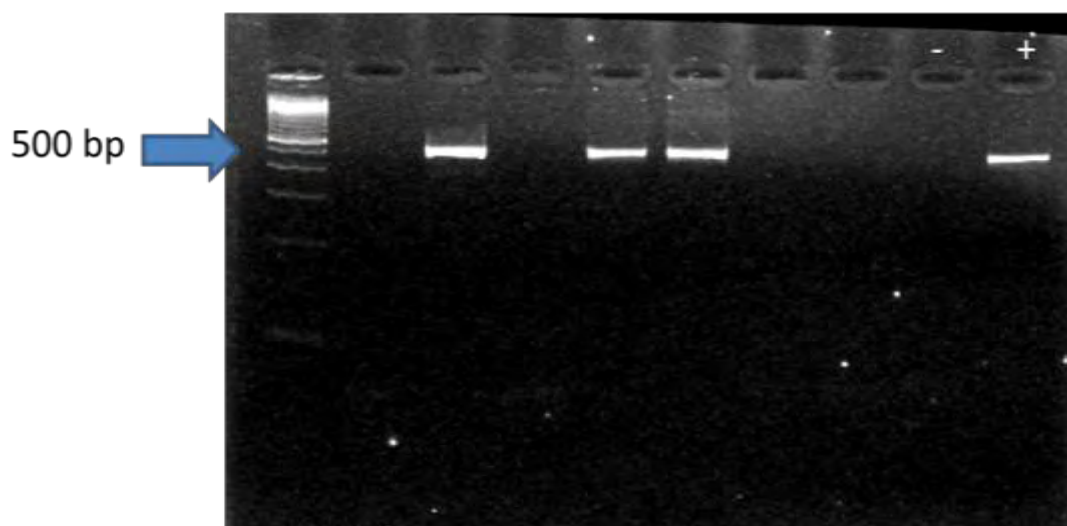
Η στενή παρακολούθηση του επιπολασμού των σεξουαλικά μεταδιδόμενων παθογόνων επί εδάφους ασυμπτωματικών πληθυσμών είναι το κλειδί για τον περιορισμό της μετάδοσης αυτών των μικροοργανισμών. Η αδιάλειπτη ενημέρωση των πληθυσμών για τα screening τεστ, η ορθή σεξουαλική διαπαιδαγώγιση τόσο από την οικογένεια και το σχολείο, όσο και από τους αρμόδιους κρατικούς φορείς, αλλά και η συνέχιση διεξαγωγής προοπτικών τυχαιοποιημένων μελετών, αποτελούν καθοριστικούς αρωγούς περιορισμού των σεξουαλικά μεταδιδόμενων παθογόνων και νοσημάτων και διαρκούς βελτίωσης της ποιότητας ζωής των ανθρώπων.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Χαρακτηριστικές εικόνες ηλεκτροφόρησης γονιδίων σε πήκτωμα αгарόζης 2% των υπό μελέτη μικροοργανισμών.



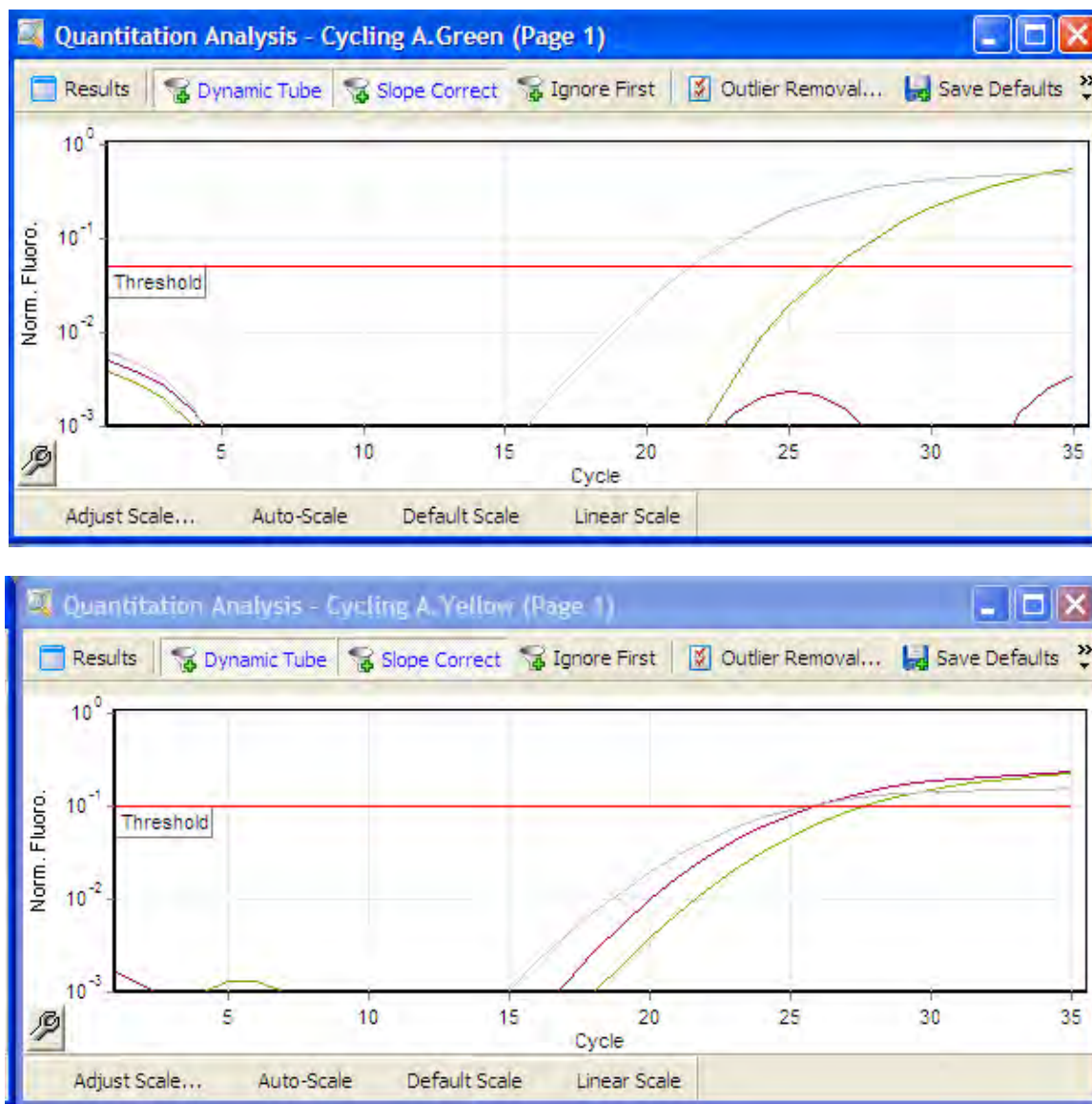
Εικόνα 1 . Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης τμήματος του γονιδίου 16S rRNA για *Ureaplasma* μεγέθους 520 bp σε 7 δείγματα.



Εικόνα 2. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης τμήματος του γονιδίου 16S rRNA για *Mycoplasma* μεγέθους 520 bp σε 7 δείγματα.

Χαρακτηριστικές εικόνες από την Real-Time PCR για κάθε ένα μικροοργανισμό

Mycoplasma hominis



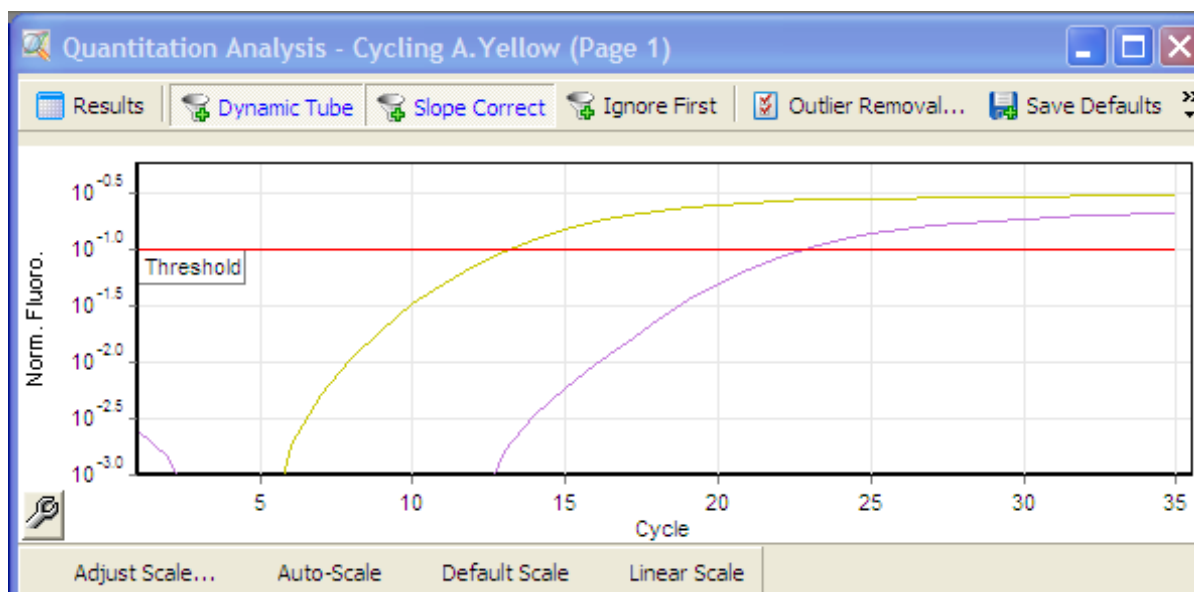
Εικόνες 3 και 4. Απεικόνιση αποτελεσμάτων Real-Time PCR. Στην πάνω φωτογραφία η καμπύλη δείχνει την ανίχνευση του *M.hominis*. Όταν η καμπύλη είναι πάνω από την γραμμή του threshold τότε το δείγμα είναι θετικό. Στην κάτω φωτογραφία η καμπύλη δείχνει το IC του μικροοργανισμού δηλαδή αν υπάρχει ή όχι DNA. Όταν η καμπύλη είναι πάνω από το threshold τότε υπάρχει DNA. Η καμπύλη με το πράσινο χρώμα είναι ένα θετικό δείγμα για *M.hominis*, η μοβ ένα αρνητικό δείγμα για *M.hominis* ενώ η γκρι καμπύλη είναι ο θετικός μάρτυρας.

Mycoplasma genitalium



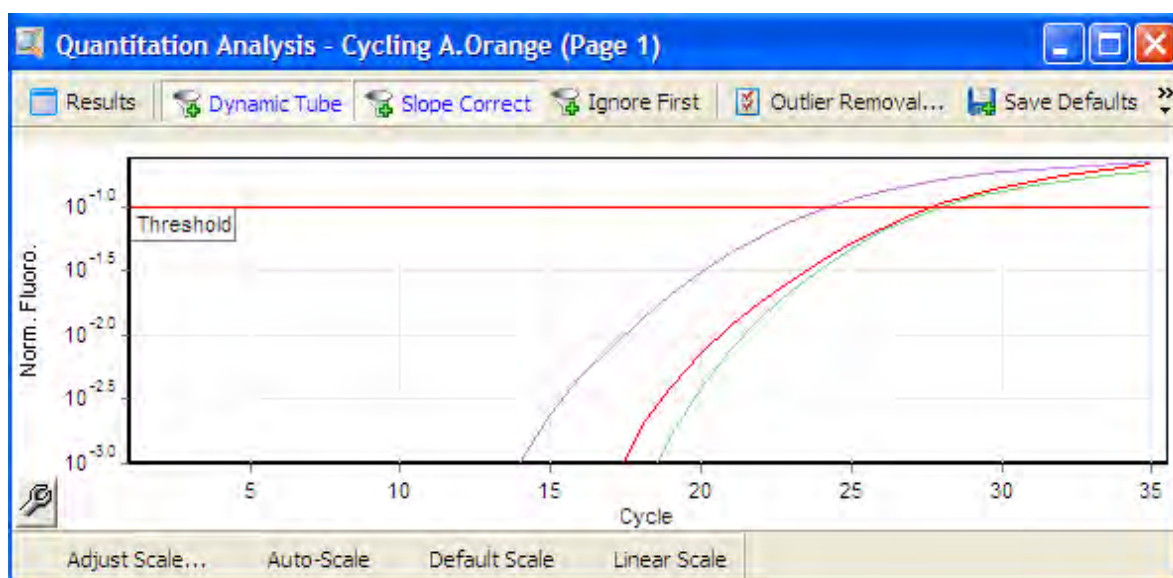
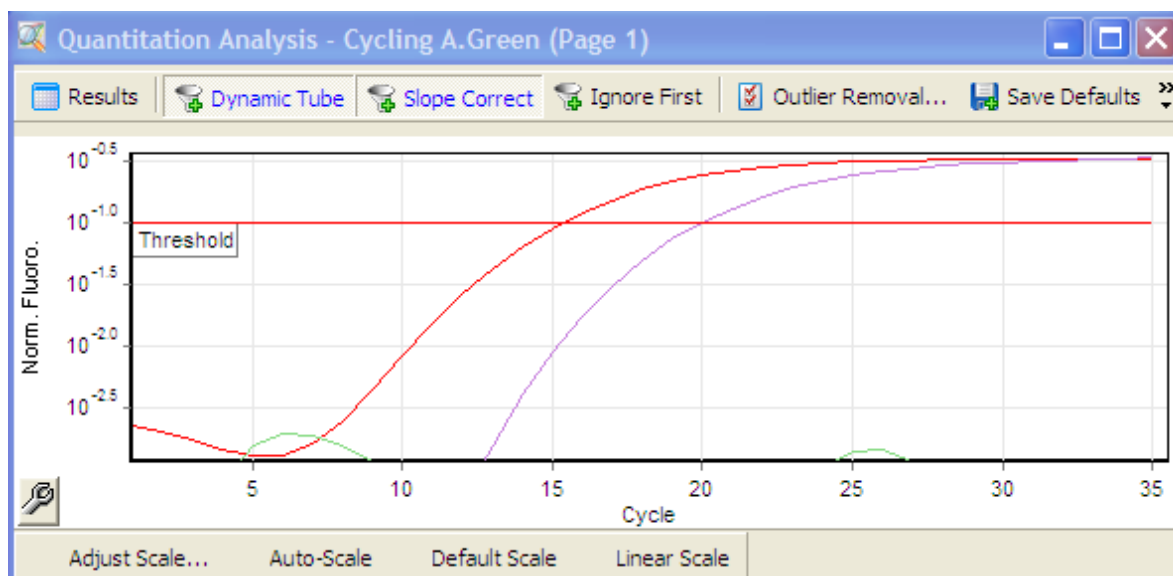
Εικόνες 5 και 6. Απεικόνιση αποτελεσμάτων Real-Time PCR. Στην πάνω φωτογραφία η καμπύλη δείχνει την ανίχνευση του *M.genitalium*. Όταν η καμπύλη είναι πάνω από την γραμμή του threshold τότε το δείγμα είναι θετικό. Στην κάτω φωτογραφία η καμπύλη δείχνει το IC του μικροοργανισμού δηλαδή αν υπάρχει ή όχι DNA. Όταν η καμπύλη είναι πάνω από το threshold τότε υπάρχει DNA. Η καμπύλη με το πράσινο χρώμα είναι ένα αρνητικό δείγμα για *M.genitalium* ενώ η μπλε καμπύλη είναι ο θετικός μάρτυρας.

Ureaplasma urealyticum



Εικόνες 7 και 8. Απεικόνιση αποτελεσμάτων Real-Time PCR. Στην πάνω φωτογραφία η καμπύλη δείχνει την ανίχνευση του *U. urealyticum*. Όταν η καμπύλη είναι πάνω από την γραμμή του threshold τότε το δείγμα είναι θετικό. Στην κάτω φωτογραφία η καμπύλη δείχνει το IC του μικροοργανισμού δηλαδή αν υπάρχει ή όχι DNA. Όταν η καμπύλη είναι πάνω από το threshold τότε υπάρχει DNA. Η καμπύλη με το κίτρινο χρώμα είναι ένα θετικό δείγμα για *U.urealyticum*, η καμπύλη με το μπλε χρώμα είναι ένα αρνητικό δείγμα ενώ η μοβ καμπύλη είναι ο θετικός μάρτυρας.

Ureaplasma parvum



Εικόνες 9 και 10. Απεικόνιση αποτελεσμάτων Real-Time PCR. Στην πάνω φωτογραφία η καμπύλη δείχνει την ανίχνευση του *U. parvum*. Όταν η καμπύλη είναι πάνω από την γραμμή του threshold τότε το δείγμα είναι θετικό. Στην κάτω φωτογραφία η καμπύλη δείχνει το IC του μικροοργανισμού δηλαδή αν υπάρχει ή όχι DNA. Όταν η καμπύλη είναι πάνω από το threshold τότε υπάρχει DNA. Η καμπύλη με το κόκκινο χρώμα είναι ένα θετικό δείγμα για *U. parvum*, η καμπύλη με το πράσινο χρώμα είναι ένα αρνητικό δείγμα ενώ η μοβ καμπύλη είναι ο θετικός μάρτυρας.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1]: Williams Obstetrics, 24th edition, Mc Graw Hill , 2014.
- [2]: Waites, K. B., Katz, B., Schelonka, R. L., Mycoplasmas and Ureaplasmas as Neonatal Pathogens, Clin. Microb. Rev. 2005, p. 757–789.
- [3]: Waites, K. B., Rikihisu, Y., Tylor-Robinson, D. J., Mycoplasmas and obligate intracellular bacteria, Murray P R., Jo Baron, E., Jorgensen, J H., Phaller, M. A., Tenover, R. H., Manual of Clinical Microbiology, 8th Edition, vol. 1, ASM Press Washington DC, 2003, 972-990.
- [4]: Αντσακλής Α., Μαιευτική και Γυναικολογία, 2011, 2^η έκδοση, εκδόσεις Παρισιάνου.
- [5]: Cassell, G. H., Waites, K. B., Watson, H. L., Crouse, D. T., Harasawa, R. Ureaplasma urealyticum Intrauterine Infection: Role in Prematurity and Disease in Newborns. 1993, Clin. Microb. Rev. 6(1): 69-87.
- [6]: Kotrotsiou, Tz., Exindari, M., Diza, E., Gioula, G., Melidou, A., Kaplanis, K., Malisiovas, N., Prevalence and antimicrobial susceptibility of Ureaplasma urealyticum in asymptomatic women in Northern Greece, 2013, Hippokratia, 17, 4: 319-321.
- [7]: Baka, S., Kouskouni, E., Antonopoulou, S., Sioutis, D., Papakonstantinou, M., Hassiakos, D., Logothetis, E., Liapis, A., Prevalence of Ureaplasma urealyticum and Mycoplasma hominis in women with chronic urinary symptoms, 2009, Urology, 74(1): 62-66.
- [8]: Tully, J.G., D. Taylor-Robinson, D.L. Rose, P.M. Furr, C.E. Graham, and M.F. Barile. 1986. Urogenital challenge of primate species with Mycoplasma genitalium and characteristics of infection induced in chimpanzees. J. Infect. Dis. 153: 1046-1054.
- [9]: Αρσένη, Α., Κλινική μικροβιολογία και εργαστηριακή διάγνωση λοιμώξεων, 1994, τόμος 2, 4^η έκδοση, εκδόσεις ΖΗΤΑ.
- [10]: Razin, S. 1978. The Mycoplasmas. Microbiological Reviews, 42:414-470.
- [11]: Razin, S., Yogen, D., Naot, Y., Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas, Microbiology and Molecular Biology Reviews, 1998, p:1094-1156.

- [12]: Maniloff, J., and H. J. Morowitz. 1972. Cell biology of the mycoplasmas, *Bacteriol. Rev.*, 36:263-290.
- [13]: Morowitz, H. J., and D. C. Wallace. 1973. Genome size and life cycle of the mycoplasma. *Ann N.Y. Acad. Sci.* 225:62-73.
- [14]: Jensen, J., Uidum, S.A., Sondergard-Andersen, J., Vuust, J., Lind, K.,: Polymerase chain reaction for the detection of *Mycoplasma genitalium* in clinical samples. *J Clin Microbiol* 1991, 29:46-50.
- [15]: Munday, P., Furr, P., Taylor-Robinson, D., The prevalence of *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* in the cervix and anal canal of women. *J.Infect.* 1981. 253-257.
- [16]: Taylor-Robinson, D., Jensen, J. S., Svenstrup, H., Stacey, C. M., Difficulties experienced in defining the microbial cause of pelvic inflammatory disease. 2012, *Int. J. STD AIDS*, 23(1): 18-24.
- [17]: Rivera, J. A., Centeno, M., Santellan, O. M., Rodriguez, N. M., Prevalencia de *Ureaplasma urealyticum* en mujeres. 2004, *Rev. Mex. Pato. Clin.*, 51(1): 33-36.
- [18]: Ramirez, C., Casanova, G., Menoca, G., Ortiz, F., Ahued, R., Prevalencia de la infeccion cervico-vaginal por *Mycoplasma hominis* y *Ureaplasma urealyticum* en pacientes ginecologicas del Instituto Nacional de Perinatologia. 2004, *Enf. Inf. Microbiol.*, 24(1): 107-111.
- [19]: Fagundo, R., Sanchez, A., Jauregui, J., Comportamiento antimicrobiano de aislamientos clinicos de *Mycoplasma hominis* y *Ureaplasma urealyticum* asi como la evolucion de su Resistencia en un period de cinco anos, 2006, *Labciencia*, 14(2): 75-79.
- [20]: Imudia, A. N., Detti, L., Puscheck, E. E., Yelian, F D., Diamond, M P., The prevalence of *ureaplasma urealyticum*, *mycoplasma hominis*, *chlamydia trachomatis* and *neisseria gonorrhoeae* infections, and the rubella status of patients undergoing an initial infertility evaluation, 2008, *J. Assist. Reprod. Genet.* 25(1): 43-46.
- [21]: Zuo, C. X., Huang, J. H., Chen, J., Lu, J. Y., Xiang, Y. P., Female urogenital *Mycoplasma* infection nad drug sensitivity statu w in Changsha. 2006, *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*, 26(6): 831-836.

- [22]: Karabay, O., Topcuoglu, A., Kocoglu, E., Gurel, S., Gurel, H., Ince, N. K., Prevalence and antibiotic susceptibility of genital *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma Urealyticum* in a university hospital in Turkey. 2006, 33(1): 36-38.
- [23]: Kechagia, N., Bersimis, S., Chatzipanagiotou, S., Incidence and antimicrobial susceptibilities of genital mycoplasmas in outpatients women with clinical vaginitis in Athens, Greece. 2008, J. antimicrob. Chemother. 62(1): 122-125.
- [24]: Jensen JS, Cusini M, Gomberg M, Moi H., : 2016 European guideline on mycoplasma genitalium infections, 2016, J Eur Acad Dermatol Venereol, Oct;30(10):1650-1656.
- [25]: Mardh P A, Westrom L. Tubal and cervical cultures in acute salpingitis with special reference to *Mycoplasma hominis* and T -strain mycoplasmas. Br J Vener Dis 1970;46:179-86.
- [26]: Falk, L., H. Fredlund, and J. S. Jensen. 2005. Signs and symptoms of urethritis and cervicitis among women with or without *Mycoplasma genitalium* or *Chlamydia trachomatis* infection. Sex. Transm. Infect. 81:73–78.
- [27]: Huard, R., C., Luiz Claudio de Oliveira Lazzrini, Butler, W., R., Dick van Soolingen, Ho, J., L., PCR-Based Method To Differentiate the Subspecies of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex on the Basis of Genomic Deletions, J Clin Microbiol. 2003 April; 41(4): 1637–1650.
- [28]: Wasinger, V.C., S.J. Cordwell, A. Cerpa-Poljak, J.X. Yan, A.A. Gooley, M.R. Wilkins, M.W. Duncan, R. Harris, K.L. Williams, and I. Humphery-Smith. 1995. Progress with gene-product mapping of the mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. Electrophoresis. 16: 1090-1094.
- [29]: Musatovova, O., S. Dhandayuthapani, and J.B. Baseman. 2003. Transcriptional starts for cytodherence-related operons of *Mycoplasma genitalium*. FEMS Microbiol. Lett. 229: 73-81.
- [30]: Pich, O., R. Burgos, M. Ferrer-Navarro, E. Querol, and J. Pinol. 2008. Role of *Mycoplasma genitalium* MG218 and MG317 cytoskeletal proteins in terminal organelle organization, gliding motility and cytodherence. Microbiology, 154: 3188-3198.
- [31]: Morrison-Plummer, J., et al. 1987. Molecular characterization of *Mycoplasma genitalium* species-specific and cross-reactive determinants: identification of an immunodominant protein of *M.genitalium*. Isr.J.Med.Sci. 23: 453-457.

- [32]: Svenstrup, H.F., P.K. Nielsen, M. Drasbek, S. Birkelund, and G. Christiansen. 2002. Adhesion and inhibition assay of *Mycoplasma genitalium* and *M. pneumoniae* by immunofluorescence microscopy. *J. Med. Microbiol.* 51: 361-373.
- [33]: Svenstrup, H. F., J. Fedder, J. Abraham-Peskir, S. Birkelund, and G. Christiansen. 2003. *Mycoplasma genitalium* attaches to human spermatozoa. *Hum. Reprod.* 18:2103–2109.
- Svenstrup, H.F., J.S. Jensen, K. Gevaert, S. Birkelund, and G. Christiansen. 2006. Identification and characterization of immunogenic proteins of *Mycoplasma genitalium*. *Clin. Vaccine Immunol.* 13: 913-922.
- [34]: Mernaugh, G.R., S.F. Dallo, S.C. Holt, and J.B. Baseman. 1993. Properties of adhering and nonadhering populations of *Mycoplasma genitalium*. *Clin. Infect. Dis.* 17: S69-S78.
- [35]: Peterson, S.N., Hu, P.C., Bott, K.F., Hutchison, C.A., 3rd, 1993. A survey of the *Mycoplasma genitalium* genome by using random sequencing. *J. Bacteriol.* 175: 7918-7930.
- [36]: Taylor-Robinson, D., et al. 1981. Urogenital mycoplasma infections of man: a review with observations on a recently discovered mycoplasma. *Isr. J. Med. Sci.* 17: 524-530.
- [37]: Fraser, C.M., Gocayne, J.D., White, O., Adams, M.D., Clayton, R.A., et al. 1995. The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*. *Science*, 270: 397-403.
- [38]: Tully, J.G., Taylor-Robins, D., Rose, L., Cole, R.M., Boye, J.M., *Mycoplasma genitalium*, a new species from the human urogenital tract. *Int. Syst. Bacteriol.* 1983, 33:387-396.
- [39]: Hamasuna, R., Osada, Y., Jensen, J.S., Isolation of *Mycoplasma genitalium* from First-Void Urine specimens by coculture with Vero cells, *J. Clin. Microbiol.* 2007. 45(3): 847-850.
- [40]: Jensen, J.S., H.T. Hansen, and K. Lind. 1996. Isolation of *Mycoplasma genitalium* strains from the male urethra. *J. Clin. Microbiol.* 34: 286-291.
- [41]: Palmer, H.M., C.B. Gilroy, P.M. Furr, and D. Taylor-Robinson. 1991. Development and evaluation of the polymerase chain reaction to detect *Mycoplasma genitalium*. *FEMS Microbiol. Lett.* 61:199-203.
- [42]: Horner, P.J., C.B. Gilroy, B.J. Thomas, R.O. Naidoo, and D. Taylor-Robinson. 1993. Association of *Mycoplasma genitalium* with acute non-gonococcal urethritis. *Lancet* 342:582-585.

- [43]: Arraiz, R.N., et al., *Mycoplasma genitalium* detection with clinical manifestations in population of the Zulia State, 2008, Venezuela. *Rev. Chil. Infectol.* 25: 256-261.
- [44]: Baczynska, A., et al. Morphology of human Fallopian tubes after infection with *Mycoplasma genitalium* and *Mycoplasma hominis*—in vitro organ culture study. 2007, *Hum. Reprod.* 22:968–979.
- [45]: Eickhoff, J. H., N. Frimodt-Moller, S. Walter, and C. Frimodt-Moller. 1999. A double-blind, randomized, controlled multicentre study to compare the efficacy of ciprofloxacin with pivampicillin as oral therapy for epididymitis in men over 40 years of age. *BJU Int.* 84:827–834.
- [46]: Anagrus, C., Lore, B., Jensen, J.S., *Mycoplasma genitalium*: prevalence, clinical significance and transmission. 2005, *Sex. Transm. Infect.* 81:458-462.
- [47]: Uno, M., et al. 1997. *Mycoplasma genitalium* in the cervixes of Japanese women. *Sex. Transm. Dis.* 24:284–286.
- [48]: Lusk, M. J., et al. 2011. *Mycoplasma genitalium* is associated with cervicitis and HIV infection in an urban Australian STI clinic population. *Sex. Transm. Infect.* 87:107–109.
- [49]: Hebb, J. K., C. R. Cohen, S. G. Astete, E. A. Bukusi, and P. A. Totten. 2004. Detection of novel organisms associated with salpingitis, by use of 16S rDNA polymerase chain reaction. *J. Infect. Dis.* 190:2109–2120.
- [50]: Moller BR, Taylor-Robinson D, Furr PM., 1984, Serological evidence Implicating *Mycoplasma genitalium* in pelvic inflammatory disease. *Lancet* 1: 1102–1103.
- [51]: Cohen, C.R., Manhart, L.E., Bukusi, E.A., Astete, S., Brunham, R.C., Association between *Mycoplasma genitalium* and acute endometritis. *Lancet* 2002. 359: 765–766.
- [52]: Haggerty CL, Totten PA, Astete SG, Lee S, Hoferka SL, et al. (2008) Failure of cefoxitin and doxycycline to eradicate endometrial *Mycoplasma genitalium* and the consequence for clinical cure of pelvic inflammatory disease. *Sex. Transm. Infect.* 84: 338–342.
- [53]: Simms I, Eastick K, Mallinson H, Thomas K, Gokhale R, et al. (2003). Associations between *Mycoplasma genitalium*, *Chlamydia trachomatis* and pelvic inflammatory disease. *J Clin Pathol* 56: 616–618.

- [54]: Clausen, H.F., Fedder, J., Drasbek, M., Nielsen, P.K., Toft, B., Serological investigation of *Mycoplasma genitalium* in infertile women. *Hum Reprod*, 2001, 16: 1866–1874.
- [55]: Deguchi, T., Maeda, S., *Mycoplasma genitalium*: another important pathogen of non-gonococcal urethritis. *J Urol*, 2002, 167:1210-1217.
- [56]: Rosenstein IJ, Morgan DJ, Sheehan M, Lamont RF, Taylor-Robinson D. Bacterial vaginosis in pregnancy: distribution of bacterial species in different gram-stain categories of the vaginal flora. *J Med Microbiol* 1996, 45:120-126.
- [57]: Ladefoged, S. A., Birkelund, S., Hauge, S., Brock, B., Jensen, L. T. & Christiansen, G. (1995). A 135-kilodalton surface antigen of *Mycoplasma hominis* PG21 contains multiple directed repeated sequences. *Infect Immun* 63,212-223.
- [58]: Bébéar, C.M., Grau, O., Charron, A., Renaudin, H., Gruson, D., and Bébéar, C., Cloning and nucleotide sequence of the DNA gyrase (*gyrA*) gene from *Mycoplasma hominis* and characterization of quinolone-resistant mutants selected in vitro with trovafloxacin, *Antimicrob. Agents Chemother.* 2000 Oct. 44(10): 2719-2727.
- [59]: Pereyre, S. P. Gonzalez, B. de Barbeyrac, A. Darnige, H. Renaudin, A., Charron, S. Raherison, C. Bebear, and C. M. Bebear, Mutations in 23S rRNA Account for Intrinsic Resistance to Macrolides in *Mycoplasma hominis* and *Mycoplasma fermentans* and for Acquired Resistance to Macrolides in *M. hominis*, *Antimicrob. Ag. And Chemoth.*, Oct. 2002, p.3142-3150.
- [60]: Nyvold, C., Birkelund, S. & Christiansen, G. (1997). The *Mycoplasma hominis* P120 membrane protein contains a 216 amino acid hypervariable domain that is recognized by the human immune response. *Microbiology* 143, 675-688.
- [61]: Huang C, Zhu HL, Xu KR, Wang SY, Fan LQ, Zhu WB. *Mycoplasma* and *Ureoplasma* Infection and Male Infertility: A Systematic Review and Metaanalysis. *Andrology*. Sep 2015;3(5):809-16.
- [62]: Thomsen AC. *Mycoplasmas* in human pyelonephritis: demonstration of antibodies in serum and urine. *J Clin Microbiol.* 1978, 8:197-202.

- [63]: Abele-Horn, M., Peters, J., Genzel-Boroviczeny, O., Wolff, C., Zimmermann, A., Gottschling, W.: Vaginal *Ureaplasma urealyticum* colonization: influence on pregnancy outcome and neonatal morbidity. *Infection* 1997, 25:286-291.
- [64]: Miller BR, Taylor-Robinson D, Furr PM, Toft B, Allen J. Serological evidence that chlamydiae and mycoplasmas are involved in infertility of women. *J Reprod Fertil* 1985. 73:237-40.
- [65]: Maeda, S., M. Tamaki, M. Nakano, M. Uno, T. Deguchi, and Y. Kawada. 1998. Detection of *Mycoplasma genitalium* in patients with urethritis. *J. Urol.* 159:405-407.
- [66]: Φωκάς, Σπ., Φωκάς, Στ., Μαρκάτου, Φ., Κλινική Μικροβιολογία, Τόμος 1, Αθήνα 2003.
- [67]: Shepard MC: The recovery of pleuropneumonia-like organisms from Negro men with and without nongonococcal urethritis. *Am J Syph Gonorr Vener Dis*, 1954, 38:113-124.
- [68]: Kong F, James G, Ma Z, Gordon S, Bin W, Gilbert GL: Phylogenetic analysis of *Ureaplasma urealyticum*—support for the establishment of a new species, *Ureaplasma parvum*. *Int J Syst Bacteriol* 1999, 49(Pt 4):1879–1889.
- [69]: Xiao L, Glass JI, Paralanov V, Yooseph S, Cassell GH, Duffy LB, Waites KB, Detection and characterization of human *Ureaplasma* species and serovars by real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2010, 48(8):2715–2723.
- [70]: Saada, A. B., Y. Terespolski, A. Adoni, and I. Kahane. 1991. Adherence of *Ureaplasma urealyticum* to human erythrocytes. *Infect. Immun.* 59:467–469.
- [71]: Harasawa R, Kanamoto Y: Differentiation of two biovars of *Ureaplasma urealyticum* based on the 16S-23S rRNA intergenic spacer region. *J Clin Microbiol* 1999, 37(12):4135–4138.
- [72]: Hannan, P. C. T. 1998. Comparative susceptibilities of various AIDS associated and human genital tract mycoplasmas and strains of *Mycoplasma pneumoniae* to 10 classes of antimicrobial agent in vitro. *J. Med. Microbiol.* 47:1115–1122.
- [73]: Kenny, G.E., and Cartwright F.D., Susceptibilities of *Mycoplasma hominis*, *M. pneumoniae*, and *Ureaplasma urealyticum* to GAR-936, Dalbapristin, Dirithromycin, Evernimicin, Gatifloxacin, Linezolid, Moxifloxacin, Quinupristin- Dalbapristin, and Telithromycin Compared to Their Susceptibilities to Reference Macrolides, Tetracyclines, and Quinolones, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2001, p: 2604-2608.

- [74]: Roberts, M. C., and G. E. Kenny. 1986. Dissemination of the tetM tetracycline resistance determinant to *Ureaplasma urealyticum*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 29:350–352.
- [75]: Burdett, V., Inamine, J. & Rajagopalan, S. (1982) *Microbiology 1982* (Schlessinger, D., ed) pp. 155-158, American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- [76]: Clegg, A., Passey, M., Yoannes, M., Michael, A., High rates of genital *Mycoplasma* infection in the highlands of Papua New Guinea determined both by culture and by a commercial detection kit. 1997, *J. Clin. Microbiol.*, 35: 197-200.
- [77]: Grenabo, L., Hedelin, H., Pettersson, S., Urinary infection stones caused by *Ureaplasma urealyticum*: a review. *Scand J. Infect. Dis.* 1988, 53:46-49.
- [78]: Waites, K. B., Katz, B., Schelonka, R. L., *Mycoplasmas and Ureaplasmas as Neonatal Pathogens*, *Clin. Microb. Rev.* 2005, p. 757–789.
- [79]: Foulon W., Naessens A., Dewaele M., Lauwers S., Amy J.J.: Chronic *Ureaplasma urealyticum* amnionitis associated with abruption placentae. *Obstet Gynecol* 1986, 68:280-282.
- [80]: Horner, P.J., B.Thomas, C.B. Gilroy, M. Egger, and D. Taylor-Robinson. 2002. Do ll men attending departments of genitourinary medicine need to be screen for non-gonococcal urethritis? *Int.J. STD AIDS* 13: 667-673.
- [81]: Fenkci, V., Yilmazer, M., Aktepe, O. Have *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* infections any significant effect on female fertility? *Le Infezioni in Medicina*, 2002, 9(5): 965-976.
- [82]: Gregoriou, O., Botsis, D., Papadias, K., Kassanos, D., Liapis, A., Zourlas, P. A. Culture of seminal fluid in infertile men and relationship to semen evaluation. *Int. Gynaecol. Odstet.* 1989, 28(2): 149-153.
- [83]: Horner, P., et al. 2003. Antibodies to *Chlamydia trachomatis* heat-shock protein 60 kDa and detection of *Mycoplasma genitalium* and *Ureaplasma urealyticum* are associated independently with chronic nongonococcal urethritis. *Sex.Transm.Dis.* 30: 129-133.
- [84]: Brachlow, A., Chatterjee, A., Stamato, T., Endocarditis due to *Kingella kingae*: A patient report. *Clinc Pediatr Dis.* 2004,43:283–6.
- [85]: Shepard MC, Lunceford CD, Differential agar medium (A7) for identification of *Ureaplasma Urealyticum* (Human TMycoplasmas) in primary cultures of clinical material. *J. Clin. Microbiol.* 1976. 3: 613-625.

- [86]: Mullis K.B. 1990. The unusual origin of polymerase chain reaction. *Sci. Am.* 262: 56.
- [87]: Kainz P. The PCR plateau phase - towards an understanding of its limitations. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1494: 23-27.
- [88]: Pfaffl MW. Chapter 3: Quantification strategies in real-time PCR. In: Bustin SA (ed) A-Z of quantitative PCR. International University Line (IUL), La Jolla, CA, USA, 2004: 89-113.
- [89]: Espy, M.J., Uhl, J.R., Sloan, L.M., Buckwalter, S.P., 2006. Real-time PCR in Clinical Microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clin. Microbiol. Rev.* 19(1): 165-256.
- [90]: Mackay IM. Real-Time PCR in the microbiology laboratory. *Clin Microbiol Infect* 2004; 10: 190-212.
- [91]: Wilhelm J. and Pingoud A. Real-Time polymerase chain reaction. *Chem BioChem* 2003; 4: 1120-1128.
- [92]: Kim Y, Kim J, Lee KA. Prevalence of sexually transmitted infections among healthy Korean women: implications of multiplex PCR pathogen detection on antibiotic therapy. *J Infect Chemother.* 2014;20:74-6.
- [93]: Hay B, Dubbink JH, Ouburg S, Le Roy C, Pereyre S, van der Eem L, et al. Prevalence and macrolide resistance of *Mycoplasma genitalium* in South African women. *Sex Transm Dis.* 2015;42:140-2.
- [94]: Magaña-Contreras M, Contreras-Paredes A, Chavez-Blanco A, Lizano M, De la Cruz-Hernandez Y, De la Cruz-Hernandez E. Prevalence of sexually transmitted pathogens associated with HPV infection in cervical samples in a Mexican population. *J Med Virol.* 2015 ;87 :2098-105.
- [95]: Leli C, Mencacci A, Bombaci JC, D'Alò F, Farinelli S, Vitali M, et al. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* in a population of Italian and immigrant outpatients. *Infez Med.* 2012 ;20 :82-7.
- [96]: Iwasaka, T., Wada, T., Kidera, Y., Sugimori, H., Hormonal status and mycoplasma colonization in the female genital tract, 1986, 68(2): 263-266.

- [97]: Deguchi, T., Yoshida, T., Miyazawa, T. Yasuda, M., Tamaki, M., Ishiko, H., Maeda, S. Association of *Ureaplasma urealyticum* (biovar 2) with nongonococcal urethritis. *Sex. Transm. Dis.* 2004, 31(3): 192-195.
- [98]: Karanikolas I., Baka S., Demeridou S., Kaparos G., Salomidou P., Genimata V., Arsenis G., Kouskouni E., Symptomatic women with non-gonococcal, non-chlamydial cervicitis show a high incidence of *Mycoplasma genitalium* in Greece, 2009, available in internet: <http://www.blackwellpublishing.com/eccmid19/abstract.asp?id=74296>
- [99]: Takahashi, S., Takeyama, K., Miyamoto, S., Ichihara, K., Maeda, T., Kunishima, Y. et al., Detection of *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* and *Ureaplasma parvum* DNAs in urine from asymptomatic healthy young Japanese men. *J. Infect. Chemother.* 2006, 12(5): 269-271.
- [100]: Kasprzykowska U, Elias J, Elias M, Mączyńska B, Sobieszczańska BM. Colonization of the lower urogenital tract with *Ureaplasma parvum* can cause asymptomatic infection of the upper reproductive system in women: a preliminary study. *Arch Gynecol Obstet.* 2014; 289:1129-34.
- [101]: Patel MA, Nyirjesy P. Role of *Mycoplasma* and *ureaplasma* species in female lower genital tract infections. *Curr Infect Dis Rep.* 2010; 12(6):417-22.
- [102]: Yamazaki T, Matsumoto M, Matsuo J, Abe K, Minami K, Yamaguchi H Frequency of *Chlamydia trachomatis* in *Ureaplasma*-positive healthy women attending their first prenatal visit in a community hospital in Sapporo, Japan. *BMC Infect Dis.* 2012; 12:82.